



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Prevalencia de genes OXA, VIM e IMP en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos del Hospital Nacional Hipólito Unanue. Agosto – diciembre 2019

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

Chris Jordan OTINIANO CORDOVA

Xiomara Alisson RIVERA PUMA

ASESORES

Dra. María Elena SALAZAR SALVATIERRA

Lic. Roky Giovanni CHAMPI MERINO (Coasesor)

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Otiniano C, Rivera X. Prevalencia de genes OXA, VIM e IMP en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos del Hospital Nacional Hipólito Unanue. Agosto – diciembre 2019 [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2021.

Metadatos complementarios

Datos de autor 1	
Nombres y apellidos	Chris Jordan Otiniano Cordova
DNI	72363955
URL de ORCID	-
Datos de autor 2	
Nombres y apellidos	Xiomara Alisson Rivera Puma
DNI	48486094
URL de ORCID	-
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	María Elena Salazar Salvatierra
DNI	08675623
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5661-4752
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Roky Giovanni Champi Merino
DNI	09913796
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-5275-4643
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.6.4. Epidemiología molecular de la resistencia bacteriana
Grupo de investigación	Biofilms Bacterianos en el Perú - BIOBACT
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Proyectos de Investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación. A19040771-PCONFIGI.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Laboratorio de Microbiología País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima

	Distrito: Lima Calle: Jr. Puno N°1002 Latitud: -12.05572 Longitud: -77.02324
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019-2020
URL de disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

PREVALENCIA DE GENES OXA, VIM E IMP EN CEPAS DE *Acinetobacter baumannii* RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS DEL HOSPITAL NACIONAL HIPÓLITO UNANUE. AGOSTO – DICIEMBRE 2019.

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**CHRIS JORDAN OTINIANO CORDOVA Y
XIOMARA ALISSON RIVERA PUMA**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado Evaluador, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

DIECINUEVE 19 (APROBADO CON MENCIÓN)

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

JURADO EVALUADOR (R.D. N.º 000073-2021-D-FFB/UNMSM)

- Dr. Víctor Crispín Pérez
- Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
- Mg. Carlos Arturo Castañeda Altamirano
- Med. José Ángel Mercedes Ortiz Rodríguez

Lima, 06 de mayo de 2021.

Dr. Víctor Crispín Pérez
Presidente

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

INFORMACIÓN GENERAL	
Título del Proyecto	Prevalencia de genes OXA, VIM e IMP en cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> resistentes a carbapenémicos del Hospital Nacional Hipólito Unanue. Agosto – Diciembre 2019.
Área de investigación (*)	Bioquímica, Microbiología y Biotecnología farmacéutica, alimentaria y toxicología.
Líneas de Investigación (*)	Mecanismos de patogenicidad y resistencia a antimicrobianos.
Ubicación geográfica donde se desarrolla la investigación (incluir localidades y/o coordenadas geográficas)	Lima Metropolitana
Institución que financia si corresponde	VRIP UNMSM
Año o rango de años que abarcó	2019-2020
DATOS DEL TESISISTA	
Apellidos y Nombres	OTINIANO CORDOVA, Chris Jordan
Número de matrícula	10040082
Indicar si es egresado o si aún está cursando estudios, de ser así especificar el año de estudios	Egresado
Código ORCID (opcional)	
DATOS DEL TESISISTA	
Apellidos y Nombres	RIVERA PUMA, Xiomara Alisson
Número de matrícula	14040059
Indicar si es egresado o si aún está cursando estudios, de ser así especificar el año de estudios	Egresada
Código ORCID (opcional)	
DATOS DEL ASESOR I	
Apellidos y nombres	SALAZAR SALVATIERRA, María Elena

Código docente: 0A0045. Categoría: Principal. Clase: TC-40 h.	
Máximo grado alcanzado	Doctora en Farmacia y Bioquímica
Código ORCID (obligatorio)	https://orcid.org/0000-0002-5661-4752
Título profesional	Químico Farmacéutica
Departamento Académico al que pertenece	D.A. Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada
Instituto de Investigación al que pertenece	Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología "Marco A. Garrido Malo". Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM
Grupo de investigación al que pertenece indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	BIOBACT Coordinadora
DATOS DEL ASESOR II	
Apellidos y nombres	CHAMPI MERINO, Roky Giovanni
Código docente: Categoría: Clase:	
Máximo grado obtenido	
Título profesional	Tecnólogo Médico
Código ORCID (obligatorio)	
Centro laboral (si es que fuera externo a la UNMSM)	Hospital Nacional Hipólito Unanue
Departamento Académico al que pertenece	Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica
Instituto de Investigación al que pertenece	
Grupo de investigación al que pertenece	BIOBACT
Indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	Investigador Externo

(*) Según documentos oficiales de la Facultad

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de ver un nuevo mañana y enseñarme que después de cada tormenta siempre vendrán días mejores.

A mis padres por su consejos y enseñanzas que me permitieron desarrollarme como persona de bien.

A mi hermanita Nayumi, por ser mi más grande motivación, por quien quiero convertirme en un modelo a seguir, su eterno héroe.

A mi compañera de vida por su eterna paciencia.

A mis mejores amigos con quienes aprendí que la sangre no es la que crea una familia.

A mi querida Doctora María Elena Salazar quien más que ser nuestra asesora y docente, ser una amiga quien supo sacar a relucir mi pasión por la investigación.

A todos y cada uno de los que hicieron posible realizar este trabajo, y a ti querido lector, a quien en su búsqueda de conocimiento comparto este trabajo.

Otiniano Cordova, Chris Jordan

DEDICATORIA

A mis padres, Juan Antonio Rivera Huamán y Amelia Puma Vilca, por haberme brindado todo su amor, confianza y paciencia infinita. Porque ustedes son mi soporte y motivación cada día.

A mis hermanos, Yosselin Rivera Puma y Jhon Rivera Puma, por los recuerdos y sueños compartidos. Por ser mis confidentes y compañeros de vida.

A mis abuelos, que cada día con su amor y gran sabiduría han formado parte importante de mi crecimiento personal y profesional.

Los amo infinitamente.

Rivera Puma, Xiomara Alisson

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por habernos dado fortaleza, voluntad, paciencia y perseverancia necesaria para poder lograr nuestros objetivos.

A nuestras familias, quienes día tras día nos demostraron su confianza, comprensión y apoyo a lo largo de del camino. Además, por ser nuestro impulso de superación en la vida.

A nuestra asesora, Dra. María Elena Salazar Salvatierra, por su rigor profesional, infinita paciencia y disponibilidad. Por brindarnos la oportunidad de realizar este trabajo bajo su supervisión y confiar en nosotros. Sin su motivación, experiencia y consejos no hubiera sido posible la elaboración de esta tesis.

A nuestro co-asesor, Lic. Roky Giovanni Champi Merino, por compartir sus conocimientos y experiencias. Y por su apoyo constante durante la elaboración de esta tesis.

A nuestros docentes del departamento académico de Microbiología y Parasitología Básica y Aplicada, por los conocimientos y gratos momentos compartidos durante la elaboración del presente trabajo.

A nuestros amigos, en especial al Lic. Dick Henry Mamani Condori, por el apoyo y confianza depositada en nosotros.

Gracias a ustedes hemos logrado concluir este trabajo con éxito.

Otiniano Cordova, Chris Jordan

Rivera Puma, Xiomara Alisson

ÍNDICE

	pg
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	3
III. OBJETIVOS	3
III.1. Objetivo general	3
III.2. Objetivos específicos	3
IV. MARCO TEÓRICO	4
IV.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	4
IV.1.1. Perspectivas históricas	4
IV.1.2. Características microbiológicas	4
IV.1.3. Importancia clínica	5
IV.1.4. Identificación molecular	11
IV.2. Mecanismos de resistencia antibacteriana	11
IV.2.1. Resistencia a betalactámicos	12
V. METODOLOGÍA	19
V.1. Tipo de estudio:	19
V.2. Material Biológico:	19
V.3. Procedimientos	20
V.3.1 Recolección de muestras	20
V.3.2 Identificación de cepas	20
V.3.3 Detección fenotípica	24
V.3.4 Detección Genotípica	26
VI. RESULTADOS	29
VI.1. Identificación y origen de cepas	29
VI.1.1. Identificación molecular	30
VI.2. Detección fenotípica de carbapenemasas	32

VI.2.1. Blue Carba	32
VI.2.2. eCIM	34
VI.2.3. Sinergismo doble disco con EDTA	36
VI.3. Detección genotípica de carbapenemasas	38
VI.3.1. Detección genotípica de Oxacilinasas.	38
VI.3.2. Detección genotípica de Metalobetalactamasas.	41
VII. DISCUSIÓN	44
VIII. CONCLUSIONES	49
IX. RECOMENDACIONES	50
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
XI. ANEXOS	63

ÍNDICE DE TABLAS

	pg
Tabla 1. Primers empleados en la identificación del gen <i>recA</i> y la región ITS en <i>A. baumannii</i>	24
Tabla 2. Condiciones de amplificación para el gen <i>recA</i> y una región ITS	24
Tabla 3. Primers empleados en la identificación de genes <i>bla_{OXA}</i> en <i>A. baumannii</i>	27
Tabla 4. Condiciones de amplificación para los genes <i>bla_{OXA}</i> en <i>A. baumannii</i>	27
Tabla 5. Primers empleados en la identificación de genes <i>bla_{VIM}</i> y <i>bla_{IMP}</i> en <i>A. baumannii</i>	28
Tabla 6. Condiciones de amplificación para el gen <i>bla_{IMP}</i> en <i>A. baumannii</i>	28
Tabla 7. Condiciones de amplificación para el gen <i>bla_{VIM}</i> en <i>A. baumannii</i>	28
Tabla 8. Detección molecular por PCR múltiple del gen <i>recA</i> y una región ITS en cepas de <i>A. baumannii</i> .	31
Tabla 9. Detección molecular por PCR múltiple de genes <i>bla_{OXA}-23-like</i> , <i>bla_{OXA}-24-like</i> , <i>bla_{OXA}-51-like</i> , <i>bla_{OXA}-58-like</i> en cepas de <i>A. baumannii</i> .	38
Tabla 10. Presencia simultánea de genes <i>bla_{OXA}-23-like</i> , <i>bla_{OXA}-24-like</i> , <i>bla_{OXA}-51-like</i> , <i>bla_{OXA}-58-like</i> en cepas de <i>A. baumannii</i> .	39
Tabla 11. Detección molecular por PCR simple del gen <i>bla_{IMP}</i> y <i>bla_{VIM}</i> en cepas de <i>A. baumannii</i> .	41
Tabla 12. Presencia simultánea de genes <i>bla_{OXA}-23-like</i> , <i>bla_{OXA}-24-like</i> , <i>bla_{OXA}-51-like</i> , <i>bla_{OXA}-58-like</i> , <i>bla_{IMP}</i> y <i>bla_{VIM}</i> en cepas de <i>A. baumannii</i> .	43

ÍNDICE DE FIGURAS

	pg
Figura 1. Mecanismos de resistencia en bacterias gram negativas.	12
Figura 2. Betalactamasas presentes en <i>Acinetobacter baumannii</i>	13
Figura 3. Extracción de ADN por HiPura®Bacterial Genomic DNA purification Kit.	23
Figura 4. Prueba de sinergismo de doble disco con EDTA.	26
Figura 5. Procedencia de aislados de <i>Acinetobacter baumannii</i> por área hospitalaria	29
Figura 6. Procedencia de aislados de <i>Acinetobacter baumannii</i> por tipo de muestra analizada.	30
Figura 7. Procedencia de aislados de <i>Acinetobacter baumannii</i> por etapas de vida de los pacientes .	30
Figura 8. Electroforesis de PCR múltiple para el gen recA y la región ITS en cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> . Muestra aba-1:aba-8.	31
Figura 9. Electroforesis de PCR múltiple para el gen recA y la región ITS en cepas de <i>Acinetobacter baumannii</i> . Muestra aba-9:aba-18.	31
Figura 10.Resultados Prueba Blue Carba por lapso de tiempo.	32
Figura 11.Prueba Blue Carba: 30 minutos..	32
Figura 12.Prueba Blue Carba: 60 minutos.	33
Figura 13.Prueba Blue Carba: 120 minutos.	33
Figura 14.Prueba Blue Carba: 150 minutos.	33
Figura 15.Resultados Prueba eCIM por segmentos.	34
Figura 16. Prueba eCIM: Control Positivo (<i>Acinetobacter baumannii</i> carbapenemasa positivo)	34
Figura 17. Prueba eCIM: Control Positivo (<i>Acinetobacter baumannii</i> metalobetalactamasa positiva)	35
Figura 18. Prueba eCIM: Control negativo (<i>Acinetobacter baumannii</i> carbapenemasas negativa)	35

Figura 19. Prueba eCIM: Muestra Aba-17 (cepa productora de carbapenemasas)	35
Figura 20. Prueba eCIM: Muestra Aba-31 (cepa productora de metalobetalactamasa)	36
Figura 21. Prueba Sinergismo doble disco con EDTA: Control Positivo (<i>Acinetobacter baumannii</i> metalobetalactamasa positiva)	36
Figura 22. Prueba Sinergismo doble disco con EDTA: Control Negativo (<i>Acinetobacter baumannii</i> metalobetalactamasa negativa)	37
Figura 23. Prueba Sinergismo doble disco con EDTA. Muestra Aba-26 cepa productora de carbapenemasas	37
Figura 24. Prueba Sinergismo doble disco con EDTA. Muestra Aba-7 (cepa productora de metalobetalactamasa)	37
Figura 25. Prevalencia de genes bla _{oxa-23-like} , bla _{oxa-24-like} , bla _{oxa-51-like} , bla _{oxa-58-like} en cepas de <i>A. baumannii</i> .	39
Figura 26. Prevalencia de dos o más genes en cepas de <i>A. baumannii</i> .	39
Figura 27. Electroforesis de PCR múltiple de genes bla _{oxa-23-like} , bla _{oxa-24-like} , bla _{oxa-51-like} , bla _{oxa-58-like} en cepas de <i>A. baumannii</i> . Muestra aba-1:aba-8	40
Figura 28. Electroforesis de PCR múltiple de genes bla _{oxa-23-like} , bla _{oxa-24-like} , bla _{oxa-51-like} , bla _{oxa-58-like} en cepas de <i>A. baumannii</i> . Muestra aba-9:aba-18.	40
Figura 29. Prevalencia de genes bla _{IMP} y bla _{VIM} en cepas de <i>A. baumannii</i> .	41
Figura 30. Electroforesis de PCR simple del gen bla _{IMP} en cepas de <i>A. baumannii</i> . Muestra aba-1:aba-8	42
Figura 31. Electroforesis de PCR simple del gen bla _{IMP} en cepas de <i>A. baumannii</i> . Muestra aba-29:aba-38.	42
Figura 32. Electroforesis de PCR simple del gen bla _{VIM} en cepas de <i>A. baumannii</i> . Muestra aba-1:aba-8.	43

ÍNDICE DE ANEXOS

	pg
ANEXO N° 01: Aprobación del proyecto de investigación	63
ANEXO N° 02: Materiales, Reactivos Y Equipos	64
ANEXO N° 03: Hipura – Bacterial Genomic DNA Purification Kit	67
ANEXO N° 04: Perfil Antimicrobiano	72
ANEXO N° 05: Datos de las cepas	73
ANEXO N° 06: Fenotipado	74
ANEXO N° 07: Genotipado	75

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

OMS:	Organización Mundial de la Salud.
OPS:	Organización Panamericana de la Salud.
UCI:	Unidad de cuidados intensivos.
CRAB:	Carbapenem-resistant <i>Acinetobacter baumannii</i> . / <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos.
PCR:	Polymerase Chain Reaction. / Reacción en cadena de la polimerasa
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ST2:	Secuencia tipo 2.
recA	Recombinasa A
ITS	Internal transcribed spacer / Espaciador transcrito interno
OXA:	Oxacilinasas
MBL:	Metalobetalactamasas
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid. / Ácido etilendiaminotetraacético
VIM:	Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase./ Metalobetalactamasa codificada por el integrón de Veroba
IMP:	Imipenemase. / Metalobetalactamasa que hidroliza Imipenem
NDM:	New Delhi metallo-beta-lactamasa. / Metalobetalactamasa de Nueva Delhi
eCIM:	Inactivación de carbapenémicos modificado con EDTA
IDSA:	Infectious Diseases Society of America. / Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas
Bap:	Biofilm-associated protein. / Proteína asociada a biopelícula
QS:	Quorum sensing. / Autoinducción.
OmpA:	Outer membrane protein A. / Proteínas de membrana externa
LPS:	Lipopolisacárido
PBP:	Penicillin-binding proteins. / Proteína de unión a penicilina
KPC:	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasas
GES:	Guyana Extended-Spectrum β -lactamases. / Betalactamasa de espectro extendido de Guyana
BLEEs:	Betalactamasas de espectro extendido
ATP:	Adenosín trifosfato

HMP-AB:	Heat-modifiable protein - <i>Acinetobacter baumannii</i> . / Proteína Modificable por calor – <i>Acinetobacter baumannii</i>
ABC:	ATP-binding cassette. / Proteínas dependientes de Adenosín Trifosfato
MFS:	Major Facilitator Superfamily. / Superfamilia de Facilitadores Principales
RND:	Resistance-nodulation-cell division. / Superfamilia Resistencia – Nodulación - División
MATE:	Multidrug and toxic compound extrusion. / Proteínas de extrusión de compuestos tóxicos y de múltiples fármacos
SMR:	Small Multidrug Resistance. / Proteínas de resistencia múltiple a fármacos pequeños
CIM:	Concentración inhibidora mínima
IS:	Insertion sequence. / Secuencia de inserción
PAE:	Péptidos antibióticos eucarióticos

RESUMEN

Acinetobacter baumannii es una bacteria oportunista causante de infecciones nosocomiales graves y multirresistentes. El principal objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar la prevalencia de los genes OXAs, VIM e IMP en cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos. Tipo de estudio observacional, descriptivo y transversal. Se analizaron 40 cepas clínicas de *A. baumannii* con un perfil de resistencia a carbapenémicos aislados en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, Lima – Perú durante el período agosto a diciembre del 2019. Los métodos fenotípicos para determinar la presencia de carbapenemasas fueron Blue Carba, sinergismo de doble disco con EDTA y eCIM, y para la identificación genotípica PCR múltiple de genes bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24}, bla_{OXA-51}, bla_{OXA-58}, bla_{IMP} y bla_{VIM}. El fenotipado del total de cepas de *A.baumannii* evidenció la presencia de carbapenemasas, 100% (40/40) presentó enzimas de tipo oxacilinasas y 7,5 % (3/40) metalobetalactamasas. El genotipado, detectó la presencia de genes bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24}, bla_{OXA-51} y bla_{IMP} con una prevalencia de 35 % (14/40), 75,5 % (29/40), 100 % (40/40) y 5 % (2/40), respectivamente. No se detectó genes bla_{OXA-58} y bla_{VIM}. Se concluyó que las cepas recolectadas, son productoras de enzimas carbapenemasas. Además, se encontró una mayor prevalencia de genes bla_{OXA-51} (100 %) y bla_{OXA-24} (75,5 %), respecto a los genes bla_{OXA-23} (35 %), y bla_{IMP} (5 %). Finalmente, no se detectó genes bla_{OXA-58} y bla_{VIM}.

Palabras claves: *Acinetobacter baumannii*, resistencia, carbapenemasas, oxacilinasas, metalobetalactamasas.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is an opportunistic bacterium that causes serious and multi-resistant nosocomial infections. The main objective of this research work was to determine the prevalence of the OXAs, VIM and IMP genes in strains of *A. baumannii* resistant to carbapenems. The type of study is observational, descriptive and transversal. 40 clinical strains of *A. baumannii* with a resistance profile to carbapenems from the Nacional Hipólito Unanue Hospital, Lima - Peru were analyzed during August to December 2019. The phenotypic methods to determine the presence of carbapenemases were Blue Carba, double synergism disc with EDTA and eCIM, followed by genotypic identification by multiple PCR of the bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24}, bla_{OXA-51}, bla_{OXA-58}, bla_{IMP} and bla_{VIM} genes. Phenotypically, the total of *A. baumannii* strains proved the presence of carbapenemases, whereof 100% (40/40) showed oxacillinase-type enzymes and 7,5 % (3/40) metalloβ-lactamases. Genotypically, the presence of the genes bla_{OXA-23}, bla_{OXA-24}, bla_{OXA-51} and bla_{IMP} were detected with a prevalence of 35 % (14/40), 75,5 % (29/40), 100 % (40/40) and 5 % (2/40), respectively. The bla_{OXA-58} and bla_{VIM} genes were not detected. It was concluded that the collected strains, are producers of carbapenemases enzymes. In addition, a higher prevalence of bla_{OXA-51} (100%) and bla_{OXA-24} (75.5%) genes was found, compared to the bla_{OXA-23} (35%), and bla_{IMP} (5%) genes. Finally, the presence of bla_{OXA-58} and bla_{VIM} genes were not detected.

Key words: *Acinetobacter baumannii*, resistance, carbapenemases, oxacillinases, metalloβ-lactamases.

I. INTRODUCCIÓN

La aparición e incremento de infecciones bacterianas resistentes al tratamiento antibiótico es una de las amenazas más graves a las que se enfrenta la salud pública ⁽¹⁾. Este incremento de la resistencia a antibióticos se debe a diferentes factores, siendo el uso inadecuado de medicamentos uno de los que más contribuye ^(1,2).

Los mecanismos de resistencia son procesos naturales básicos para la supervivencia de los microorganismos, y son causadas por la capacidad de estos a sufrir modificaciones y mutaciones ⁽³⁾. Este mecanismo puede darse por síntesis de enzimas que inactivan al antimicrobiano o por mecanismos no enzimáticos ⁽⁴⁾. En la última década la resistencia a antibióticos entre las diferentes especies de *Acinetobacter* se ha incrementado de manera sustancial, en especial de *Acinetobacter baumannii*. Entre los mecanismos de resistencia de *Acinetobacter baumannii* se encuentra la producción betalactamasas, el incremento en la expresión de bombas de eflujo, así como la pérdida de porinas y la alteración de proteínas de membrana ^(5,6).

Acinetobacter baumannii es una bacteria oportunista causante de infecciones nosocomiales graves y multirresistentes, especialmente en unidad de cuidados intensivos. Los tipos de infecciones asociadas a esta bacteria incluyen neumonías, bacteriemia, infecciones en el tracto urinario, infecciones en la piel y tejidos blandos entre otros ⁽⁵⁾. Estos problemas de infección se ven agravados por su capacidad de sobrevivir durante tiempo prolongado en el ambiente intrahospitalario, su facilidad para diseminarse y transmitirse a través de reservorios animados e inanimados, y en especial por su resistencia a antimicrobianos ^(5,7).

Los carbapenémicos han sido usados como antibióticos de primera línea en infecciones graves de *A. baumannii*; no obstante, en la actualidad este grupo antibióticos se ha visto considerablemente afectado por el desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia ⁽⁴⁾. La resistencia a carbapenémicos se ha asociado con la presencia diferentes enzimas de tipo betalactamasas. Estas enzimas hidrolizan, al menos parcialmente, carbapenémicos y otros betalactámicos ⁽⁸⁾. En particular,

las enzimas de clase B (metalobetalactamasas) y clase D (oxacilinasas), según la clasificación de Ambler, han sido identificadas en cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos ^(9,10). Las metalobetalactamasas; codificadas por los genes VIM, IMP, SIM y NDM, son enzimas dependientes del zinc capaces de hidrolizar todos los betalactámicos, incluso carbapenémicos. Las oxacilinasas; codificadas por los genes OXA, se presentan con mayor frecuencia en *A. baumannii* e hidrolizan con menor potencia los carbapenémicos ⁽¹¹⁾.

Como se ha descrito, el principal mecanismo de resistencia en *Acinetobacter baumannii* se encuentra asociado a la presencia de genes Oxas, especialmente la de tipo bla_{Oxa51}, bla_{Oxa-23}, bla_{Oxa-24}, bla_{Oxa-58}, y genes bla_{VIM} e bla_{IMP} ⁽¹²⁾. Los genes Oxas se caracterizan por su alta variabilidad genética, siendo identificados principalmente genes de resistencia adquirida, no obstante, se ha demostrado que poseen genes de origen natural, como el gen bla_{Oxa-51} ^(12,13). La presencia de genes de resistencia tipo metalobetalactamasas están asociadas con las altas tasas de morbilidad y mortalidad. Hasta la fecha se han identificado diferentes genes, como bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{GIM}, bla_{SPM}, bla_{DIM}, bla_{SIM} y bla_{NDM}, de los cuales, el gen bla_{VIM} y bla_{IMP} son predominantes en *Acinetobacter baumannii* ^(14,15).

En el Perú, no existen datos clínicos y microbiológicos suficientes sobre *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos por acción enzimática. Por ello, se considera de gran importancia la necesidad de realizar investigaciones que contribuyan con el conocimiento del comportamiento fenotípico y genotípico de estas enzimas en *Acinetobacter baumannii*. La identificación de mecanismos de resistencia de *A. baumannii* contribuirá a mejorar el manejo de las infecciones causadas por este organismo, no sólo en el hospital de estudio sino también como referencia a otras instituciones de salud en el Perú. Los resultados que se obtengan servirán para orientar la toma de decisiones en los esquemas terapéuticos, así como evaluar nuevas estrategias respecto a las medidas de prevención y control de las infecciones causadas por esta bacteria.

II. HIPÓTESIS

Existe prevalencia de genes OXAs, VIM e IMP en cepas de *Acinetobacter baumannii* aislados en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, Lima – Perú durante el período agosto a diciembre del 2019.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general

Determinar la prevalencia de los genes OXAs, VIM e IMP en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos aislados en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, Lima – Perú durante el período agosto a diciembre del 2019.

III.2. Objetivos específicos

- III.2.1.** Determinar la presencia de carbapenemasas mediante el método de Blue Carba.
- III.2.2.** Determinar la presencia de metalobetalactamasas mediante el método de eCIM y la prueba de sinergismo de doble disco con EDTA.
- III.2.3.** Determinar la prevalencia de los genes Oxa23, Oxa24, Oxa51, Oxa58 en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos.
- III.2.4.** Determinar la prevalencia de los genes VIM e IMP en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos.

IV. MARCO TEÓRICO

IV.1. *Acinetobacter baumannii*

IV.1.1. Perspectivas históricas

La historia taxonómica del género *Acinetobacter* se singulariza por una serie de modificaciones a través del tiempo. En 1911, el microbiólogo danés Beijerinck describió por primera vez un microorganismo de este género, al que nombró *Micrococcus calcoaceticus* ⁽¹⁶⁾. A partir de entonces, se incluyeron diversos microorganismos en el género *Acinetobacter*, como bacterias gram negativas, inmóviles, saprófitas, oxidasa negativas y positivas, las cuales se diferencian de otros microorganismos por la ausencia de pigmentación ^(16,17).

La denominación del género *Acinetobacter* fue planteado por Brisou y Prevot en 1954, con la finalidad de diferenciar bacterias móviles de las inmóviles del género *Achromobacter* ^(16,18). En 1971, se recomendó que el género *Acinetobacter* solo debía abarcar bacterias gram negativas, oxidasa negativa e inmóviles. La diferenciación mediante pruebas bioquímicas de las diferentes especies resultaba complicada, de modo que, Bouvet y Grimont en 1986 propusieron una clasificación que distingue 12 genoespecies mediante la técnica hibridación del ADN – ADN y características nutricionales. Asimismo, a través de los años se han ido incorporando nuevas genoespecies en dicho género ^(17,19-21).

Actualmente, el género *Acinetobacter* pertenece a la familia Moraxellaceae, e incluye 63 especies identificadas por hibridación ADN – ADN ^(17,22). *Acinetobacter baumannii* es considerada la especie más representativa, debido a que se ha reportado con mayor frecuencia en infecciones intrahospitalarias, mientras que otras especies, tales como *Acinetobacter nosocomialis*, *Acinetobacter pittii*, *Acinetobacter seifertii*, *Acinetobacter dijksborniae*, solo se han identificado de manera ocasional ^(21,23).

IV.1.2. Características microbiológicas

Acinetobacter baumannii es una bacteria gram negativa, inmóvil, aerobia estricta, catalasa positiva, oxidasa negativa e indol negativa. Presenta forma de bacilo durante la fase logarítmica y de cocobacilo durante la fase estacionaria, suelen

estar agrupadas en parejas, cadenas o irregularmente ^(17,24). Por lo regular se presenta encapsulado y con predisposición a retener cristal violeta, por tal motivo, suele ser identificada incorrectamente como un coco gram positivo. Además, por su morfología a menudo es confundida con *Neisseria* o *Moraxella* en la coloración de Gram, lo cual se esclarece por medio de la reacción negativa a la oxidasa característica de *Acinetobacter*. Este bacilo se diferencia de otras enterobacterias por su incapacidad de desarrollarse en un medio anaeróbico y reducir nitrato ⁽²⁴⁾.

Las colonias de *Acinetobacter baumannii* poseen un diámetro de 1 - 2 mm, son opacas o translúcidas, y mucoides con superficies lisas o en ocasiones con depresiones ^(24,25). Algunas de las características que permiten diferenciarla de las otras especies de *Acinetobacter* son la hemólisis, crecimiento bacteriano a 44 °C y diferencia en el consumo de fuentes de carbono ^(17,20,24).

IV.1.3. Importancia clínica

La mayor parte del género *Acinetobacter* puede hallarse en entornos naturales e incluso puede formar parte de la microbiota cutánea. Sin embargo, *A. baumannii* es un patógeno oportunista que no se observa con regularidad en la naturaleza y evidencia un alto riesgo a provocar infecciones en pacientes inmunocomprometidos, encontrándose con mayor frecuencia en unidades de cuidados intensivos y unidades de pacientes quemados ^(6,17).

A. baumannii presenta características que la distingue de otras bacterias gram negativas como el sobrevivir por periodos prolongados de tiempo en el entorno hospitalario, su facilidad para diseminarse y transmitirse a través de reservorios humanos o materiales inertes, y especialmente por la habilidad de desarrollar resistencia a diversos antimicrobianos, lo que la ha convertido en uno de los mayores agentes biológicos causante de diversas infecciones en el ámbito intrahospitalario, generando así notables tasas de mortalidad ^(7,17,26).

Desde el año 2006 la “Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas” considera a esta bacteria dentro de los patógenos responsable de la mayor parte de infecciones intrahospitalarias potencialmente graves, y que se caracterizan por

una creciente resistencia a antimicrobianos ⁽²⁷⁾. A partir del año 2008, se agrupó a estos patógenos nosocomiales con el acrónimo ESKAPE, que abarca especies gram positivas y gram negativas, formadas por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* ⁽²⁸⁾. La “Organización Mundial de la Salud” (OMS) en el 2017, publicó una lista de prioridad global de bacterias resistentes a antimicrobianos para orientar la investigación, desarrollo y descubrimiento de nuevos antibióticos, en la cual ubica a *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos como prioridad crítica ⁽²⁹⁾.

IV.1.3.1. Factores de riesgo

La infección por *Acinetobacter baumannii* depende de factores que predisponen al hospedero y factores de virulencia de la bacteria. Entre los principales factores que predisponen al paciente a desarrollar una infección se incluyen: la estadía prolongada en el ambiente hospitalario, sobre todo en UCI, cirugías recientes, tratamientos con agentes antimicrobianos, pacientes con ventilación mecánica, pacientes con equipos invasivos. El factor de riesgo más significativo es el tratamiento con agentes antimicrobianos, debido a que la administración previa de estos puede alterar la microbiota habitual y traer como consecuencia la aparición de bacterias resistentes como *Acinetobacter baumannii* ^(17,30).

IV.1.3.2. Factores de virulencia

En comparación con otros patógenos gram negativos, se han identificado relativamente una menor cantidad de factores de virulencia para *Acinetobacter baumannii*. No obstante, existen varios factores que favorecen a la patogenicidad de este microorganismo.

A. Formación de biopelículas

La adherencia de *A. baumannii* a superficies bióticas y abióticas da como resultado el desarrollo de biopelículas, favoreciendo su supervivencia en condiciones ambientales adversas y permitiendo una mayor protección contra los antimicrobianos ⁽³¹⁾. Las cepas de *A. baumannii* forman biopelículas en diferentes superficies y pueden desarrollar biopelículas de alta biomasa en acero inoxidable, poliestireno y policarbonato ⁽³²⁾.

La proteína Bap posee un papel primordial en la adhesión y desarrollo de la configuración tridimensional de la biopelícula. Aunque la mayoría de las cepas secuenciadas de *Acinetobacter baumannii* llevan un gen Bap, muchas parecen tener secuencias interrumpidas o truncadas ^(20,32). Los factores de virulencia como la formación de biopelículas y la motilidad, están regulados por el sistema quórum sensing (QS) a través de moléculas de señal llamadas “inductores”, que permiten la comunicación entre las bacterias para mantener la densidad de la población ⁽²⁹⁾. Además, la formación de biopelículas se ve influenciada por señales ambientales como la temperatura y la concentración de hierro libre extracelular, que son relevantes para la interacción de *A. baumannii* con el huésped, también afectan la cantidad de biopelícula formada por este patógeno en superficies abióticas ⁽³²⁾.

El sistema quórum sensing se ha convertido en una estrategia principal e importante para la creación de nuevos fármacos y terapias contra varios patógenos bacterianos, ya que la interrupción del mecanismo de señal QS puede atenuar la virulencia del organismo, por lo tanto, disminuiría el potencial de desarrollo de resistencia ⁽³³⁾.

B. Proteínas de membrana externa (OmpA)

La proteína OmpA tiene un papel fundamental en la adhesión a las células epiteliales y posterior invasión, lo que facilita la diseminación durante la infección; también es capaz de interactuar con componentes de la vía alterna del sistema de complemento para evitar la muerte bacteriana. Además, puede facilitar la persistencia y supervivencia de *A. baumannii* al ayudar a la formación de biopelículas y la motilidad de la superficie ^(20,31,34).

Esta proteína se une a las células epiteliales y se dirige a las mitocondrias, donde se transloca al núcleo e induce la muerte celular. Además, también se ha asociado con la resistencia a antibióticos, que sugiere la posible participación de OmpA en la extrusión de compuestos desde el espacio periplásmico por medio de la membrana externa y se acople con los sistemas de salida de la membrana interna, como las bombas de salida de la superfamilia facilitadora principal (MFS) ⁽³⁵⁾.

C. Lipopolisacárido (LPS)

El papel de lipopolisacáridos en la patogénesis de *A. baumannii* está relacionado a la activación de la respuesta inmunitaria innata, desencadenando la respuesta inflamatoria del huésped ⁽³¹⁾. Se ha demostrado que un mutante con una glucoforma LPS altamente truncada, muestra una reducida resistencia al suero humano y un menor índice de supervivencia en tejidos blandos de los sujetos de prueba (ratas), en comparación con la cepa parental isogénica ^(20,31,34).

D. Polisacárido capsular

El polisacárido capsular también se ha identificado como un factor de patogenicidad en *A. baumannii*. En cepas mutantes que carecen de un fenotipo de capsula se evidenció un menor crecimiento en líquido ascítico y suero humano, como sugiere el estudio de Russo *et. al* ⁽³⁶⁾. Por lo tanto, el polisacárido capsular al igual que el LPS parecen ser esenciales en la defensa bacteriana frente a la respuesta inmunitaria inespecífica del hospedero ^(31,34).

E. Fosfolipasa D y C

Las fosfolipasas son enzimas que favorecen el desarrollo de patogenicidad en bacterias gram negativas, a través de la ruptura de los fosfolípidos presentes en la membrana celular, y degradando los fosfolípidos que conforman las barreras mucosas con el fin de facilitar la invasión bacteriana ⁽³¹⁾.

En *A. baumannii*, la interrupción de uno de los genes codificantes para la fosfolipasa D afecta la supervivencia bacteriana en suero y pérdida de la facultad para invadir células del tejido epitelial, mientras que si se inactiva uno de los genes de la fosfolipasa C reduce moderadamente la capacidad de la cepa mutante para favorecer la muerte celular ^(20,31).

F. Proteína de unión a penicilina (PBP)

Las PBP participan en la unión e inactivación de betalactámicos. Sin embargo, estas proteínas también participan en la síntesis biológica de la capa de peptidoglucano y, por lo tanto, favorecen la estabilidad celular bacteriana ^(31,34).

G. Vesícula de membrana externa

Estas vesículas intervienen en el ingreso de factores de virulencia al interior de las células del huésped, facilitando así la transferencia genética lateral y la defensa a las bacterias frente a la respuesta inmunitaria del huésped ^(20,31).

H. Sistema de adquisición de hierro mediado por acinetobactina

El crecimiento y patogenicidad de la mayoría de bacterias se ve mediado por la presencia de hierro. En las células del huésped, la disponibilidad de Fe^{3+} es baja debido a su escasa solubilidad en condiciones aeróbicas, porque se encuentra unido a compuestos de bajo peso molecular como la hemoglobina o quelado con proteínas de alta afinidad como la lactoferrina y transferrina. Por lo tanto, en respuesta al escaso hierro, las bacterias aeróbicas optan por desarrollar sistemas de adquisición de hierro de alta afinidad conocidos como sideróforos ^(31,34).

El sistema mejor caracterizado para *A. baumannii* es mediado por la acinetobactina y desempeña un rol crítico en la capacidad de esta bacteria para persistir y causar daño celular ^(20,31).

IV.1.3.3. Infecciones por *Acinetobacter baumannii*

Las infecciones producidas por *Acinetobacter baumannii* incluyen neumonía y septicemias en pacientes inmunocomprometidos. También está relacionado a infecciones de los tejidos blandos y piel, infecciones del tracto urinario, endocarditis y meningitis ^(5,26).

A. Neumonía intrahospitalaria

La relación de la neumonía con la ventilación mecánica se debe al empleo de dispositivos externos que alteran las barreras de defensa natural, y facilitan la transmisión cruzada de patógenos ⁽³⁷⁾. La neumonía intrahospitalaria asociada a ventilación mecánica es la infección que se presenta con mayor frecuencia por *Acinetobacter baumannii* producto de la colonización de la vía aérea a través de la exposición ambiental, que se ve favorecida por el tiempo prologado de ventilación mecánica que provoca la contaminación de los dispositivos médicos ^(20,31). Además de la neumonía nosocomial, se ha relacionado a *Acinetobacter baumannii* con

la neumonía adquirida en la comunidad, la cual se presenta con menor frecuencia y está asociada con factores de riesgo del huésped ⁽³¹⁾.

B. Bacteriemia

Las bacteriemias por *Acinetobacter baumannii* ocurren principalmente en pacientes con comorbilidad significativa sometidos a procedimientos invasivos y que han recibido con frecuencia una terapia antimicrobiana previa. Las fuentes comunes de infecciones en sangre por esta bacteria son las infecciones del sistema respiratorio inferior y los dispositivos de uso intravascular, asimismo se ha relacionado con infecciones en heridas y del tracto urinario ^(31,38).

C. Infecciones en piel y tejidos blandos

Las infecciones desarrolladas por de *A. baumannii* en tejido epidérmico y tejido blando se ha evidenciado en pacientes con comorbilidades (diabetes, cirrosis o algún trauma), bacteriemia, resistencia a múltiples fármacos y presencia de otros patógenos ^(39,40).

D. Infecciones en el tracto urinario

Acinetobacter baumannii es la segunda bacteria no fermentadora aislada con frecuencia de muestras humanas y está asociada a infecciones complicadas en el tracto urinario ⁽⁴¹⁾. A pesar de que no se encuentra dentro de los principales patógenos responsables de estas infecciones, se ha evidenciado un incremento en su aparición. Las infecciones por *Acinetobacter baumannii* aumentan cuando el paciente es portador de catéter urinario debido al riesgo de infección durante la técnica de colocación y durante las manipulaciones posteriores ^(20,42).

E. Meningitis

La meningitis por *Acinetobacter baumannii* en pacientes recuperados de procedimientos neuroquirúrgicos representa un problema cada vez mayor, debido a que su presencia en cultivos de líquido cerebroespinal evidencia una dificultad para lograr concentraciones efectivas de fármacos en las membranas meníngeas ^(20,31).

F. Otras manifestaciones

Acinetobacter baumannii se ha relacionado con menor frecuencia a patologías clínicas como osteomielitis, endocarditis entre otras. Se ha evidenciado un incremento de su presencia en casos de osteomielitis, en los cuales los pacientes tienen como único factor que predispone, el haber sufrido un traumatismo ^(31,40). Los casos reportados de endocarditis por *A. baumannii* son poco frecuentes y la mayoría, está asociada con la utilización de válvulas protésicas y catéteres intravasculares ^(20,31).

IV.1.4. Identificación molecular

Con el paso del tiempo se han implementado numerosas técnicas de identificación molecular para *A. baumannii*, como el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), análisis de restricción ribosomal amplificado (ARDRA), el espaciador del transcrito interno (ITS) de la región 16S-23S del ARNr, la secuenciación de la subunidad β de la polimerasa de ARN (*rpoB*), la hibridación ADN-ADN, *recA*, ribotipado manual, *gyrB* y OXA-51, siendo el elevado costo, y complejidad del método, los principales inconvenientes en la realización de estas metodologías en el diagnóstico clínico ⁽⁴³⁻⁴⁵⁾.

IV.2. Mecanismos de resistencia antibacteriana

La OMS detalla que desde el año 2001, la resistencia bacteriana ha emergido como un problema a nivel mundial, siendo el uso indiscriminado de antibacterianos en infecciones nosocomiales una de las principales causas del desarrollo de resistencia bacteriana ⁽⁴⁶⁾. En la actualidad *Acinetobacter baumannii* es resistente a casi todos los antibióticos betalactámicos, especialmente a cefalosporinas, penicilinas y carbapenémicos, lo que la relaciona con altos índices de morbilidad y mortalidad ⁽⁴⁷⁾. La capacidad de *A. baumannii* para adquirir diversos mecanismos de resistencia bacteriana, ha favorecido el brote de cepas multirresistentes a nivel global ⁽⁴⁸⁾. Su farmacorresistencia está mediada por distintos mecanismos conocidos (disminución de la entrada de fármacos, eflujo activo, inactivación enzimática y modificación de sitios diana), los cuales pueden ser intrínsecos o adquiridos ^(43,49).

Acinetobacter baumannii se describe como la única bacteria gram negativa naturalmente transformable, por estar facultada para el intercambio genético y presenta resistencia intrínseca a aminopenicilinas, cloranfenicol y cefalosporinas de primera y segunda generación ^(43,46,47).

IV.2.1. Resistencia a betalactámicos

Actualmente, *Acinetobacter baumannii* posee resistencia a la mayoría de betalactámicos ⁽⁴³⁾. Frecuentemente se pueden encontrar estas cepas multifarmacorresistentes en hospitales, destacando las CRAB (carbapenems Resistant *Acinetobacter baumannii*). En términos generales la resistencia puede deberse a la incorporación de información genética, sin embargo, la resistencia de *Acinetobacter baumannii* incluye diversos mecanismos, entre ellos, la acción enzimática, los transportadores de membrana, alteración en la permeabilidad de la membrana, rutas metabólicas alternas y modificación del sitio blanco ^(23,47), (figura 1).

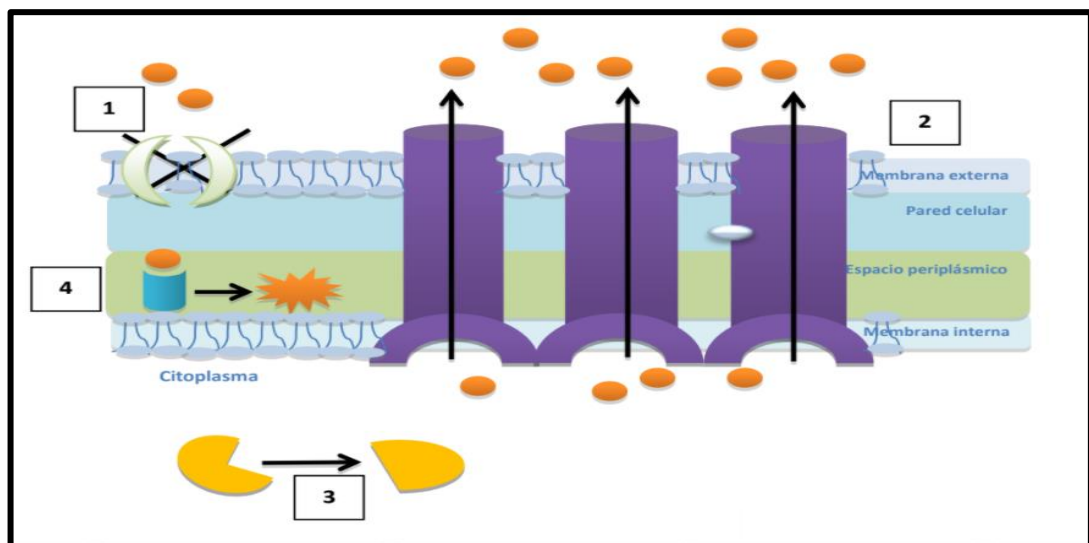


Figura 1. Mecanismos de resistencia en bacterias gram negativas.

- 1) Disminución de la entrada del antibiótico a través de la membrana externa.
- 2) Incremento de la salida del antibiótico mediada por bombas de eflujo.
- 3) Modificación del sitio blanco.
- 4) Inactivación del antibiótico por enzimas.

Fuente: Modificado de Schmieder y Edwards, 2012 ⁽⁴⁷⁾.

IV.2.1.1. Mecanismos de resistencia enzimáticos

La expresión de enzimas capaces de alterar la estructura y función de los antibióticos es una de las principales formas de resistencia en *Acinetobacter baumannii* ⁽¹¹⁾.

La clasificación de Ambler permite clasificar las enzimas betalactamasas, de acuerdo, a la homología de los aminoácidos ^(43,50). Las enzimas de clases A, C y D son serina betalactamasas, debido a que para hidrolizar el anillo betalactámico emplea un residuo de serina en el sitio activo de la enzima. Las enzimas de clase B son metalobetalactamasas, porque utilizan al menos un ion de zinc divalente para hidrolizar el enlace amida del anillo betalactámico ^(3,43) (Figura 2).

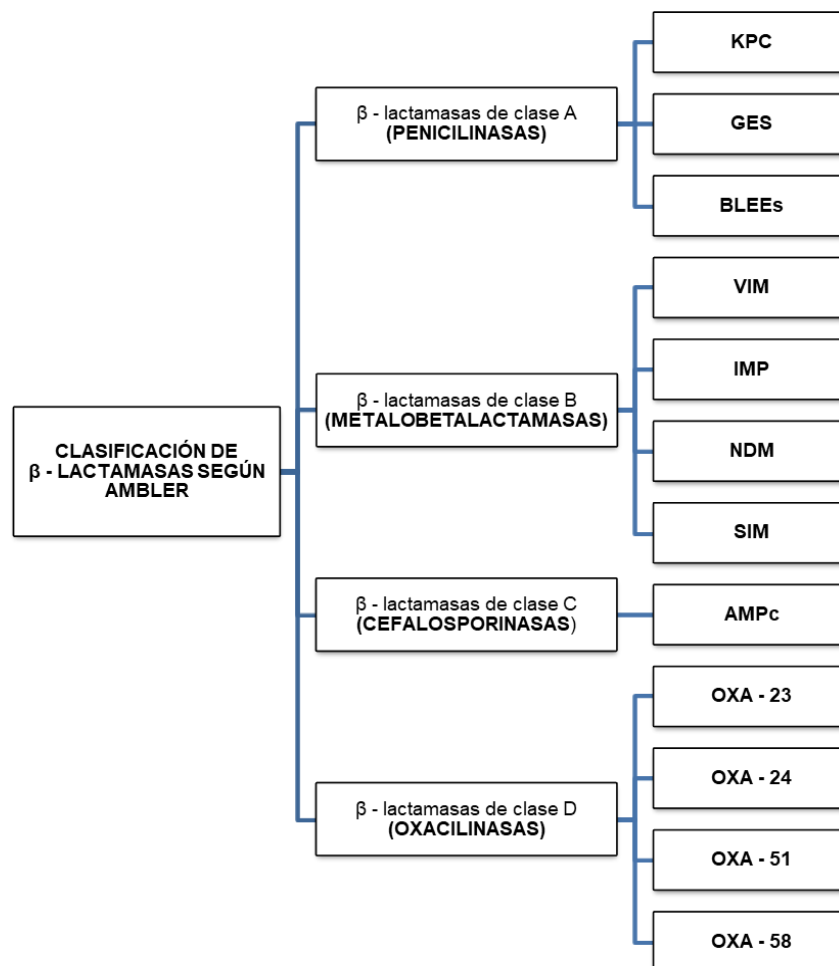


Figura 2. Betalactamasas presentes en *Acinetobacter baumannii*.

Fuente: Elaboración propia.

A. betalactamasas de Clase A

En *Acinetobacter baumannii* se han identificado las familias KPC y GES, que se encuentran localizadas en integrones de clase 1. La familia KPC hidroliza los antibióticos betalactámicos, incluidos los carbapenémicos. Fue identificada inicialmente en un aislado de *Klebsiella pneumoniae* y luego en otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, por ello, la presencia reciente de genes de esta familia en *Acinetobacter baumannii* sugiere la posibilidad de transmisión genética horizontal^(47,51).

Por otra parte, se han reportado aislamientos portadores de betalactamasas de espectro reducido como TEM y CARB-5, que hidrolizan la ampicilina, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas^(20,47,48). Además, se han descrito betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), capaces de hidrolizar cefalosporinas de tercera y cuarta generación asociadas a *Acinetobacter sp*, como los genes PER-1, PER-2, VEB-1, DHV y CTX-M-2^(8,48).

B. betalactamasas de Clase B

Las metalobetalactamasas presentan una mayor capacidad catalítica que las enzimas de clase D, por lo tanto, pueden degradar toda clase de betalactámicos; excepto monobactámicos^(43,46,47). Son resistentes a los inhibidores de betalactamasas, como el ácido clavulánico y tazobactam, pero al presentar el ion zinc en su estructura son fácilmente inhibidos *in vitro* por el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Sin embargo, esta inhibición puede ser restaurada mediante la adición de zinc^(43,46,49).

En *Acinetobacter*, se han descrito las MBL de clase IMP, VIM, SIM y NDM. El grupo IMP contiene IMP-1,-2,-4,-5,- 6 y -11, el grupo VIM contiene VIM-1 y -2, y finalmente SIM-1, NDM -1. Las variantes de IMP y VIM confieren un elevado perfil de resistencia (CMI >32 mg/L), mientras que la presencia de SIM-1 genera niveles de inferiores de resistencia a Imipenem (CMI entre 8 - 16 mg/L). Además, recientemente se ha reportado un nuevo tipo de MBL denominada NDM en *Acinetobacter baumannii*, identificada inicialmente en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*^(47,49,52).

Los genes tipo bla_{IMP} y bla_{VIM} se encuentran frecuentemente localizadas en integrones de clase 1. Estos integrones tienen la capacidad de obtener casettes genéticos a través de una recombinación específica entre dos sitios de ADN. Sin embargo, estos cassette genéticos no se movilizan entre diferentes especies bacterianas y requieren la ayuda de elementos genéticos como plásmidos y transposones. La mayoría de genes bla_{IMP} y bla_{VIM}, entre otras metalobetalactamasas se encuentran formando parte de plásmidos o transposones, lo que les permite transferirse con facilidad de unas bacterias a otras (53).

C. betalactamasas de Clase C

Son enzimas que presentan un perfil hidrolítico sobre penicilinas y cefalosporinas, con excepción de cefepime. *A. baumannii* presenta la enzima ADC (*Acinetobacter* Derived Cephalosporinase), una cefalosporinasa cromosómica de tipo ampC (23,48,54).

La resistencia a cefalosporinas de amplio espectro incluyendo cefepime está relacionada al aumento de expresión del gen blaAmpC, asociada a la presencia de la secuencia de inserción ISAba1 (49,54). Por otro lado, las enzimas AmpC presentan baja afinidad para fármacos carbapenémicos, no obstante, la sobreproducción de esta enzima asociada a modificaciones en la permeabilidad de la membrana puede producir fenotipos de resistencia a estos antibióticos (11,49).

D. betalactamasas de Clase D

También conocidas como oxacilinasas, se encuentran principalmente en *enterobacterias*, y gram negativas no fermentadoras como *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Estas enzimas hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos (43,46).

Las enzimas oxacilinasas representan una de las clases moleculares con mayor número de variantes. En *Acinetobacter baumannii*, se han descrito cuatro subgrupos fitogénicos; los cuales son: OXA-23 (-27 y -49), OXA-24 (-25, -26, y -40), OXA-51 (-64, -65, -66, -68, -69, -70, -71, -78, -79, -80, - 82) y OXA-58 (43,47,48). La expresión

de estas enzimas se ve aumentada cuando el gen va acompañado de las secuencias de inserción ISAb1, ISAb3, ISAb4, ISAb10 e ISAb18 ^(43,55).

La familia OXA-51 comprende carbapenemasas cromosómicas, y ha sido descrita como intrínseca a *Acinetobacter baumannii*, por lo tanto, al ser constitutivo se encuentra globalmente distribuido ^(49,52). Los genes oxacilinasas de los grupos OXA-23, -24 y -58 pueden ubicarse a nivel cromosomal o dentro de plásmidos. El gen OXA-23 codifica la primera OXA con actividad carbapenemasa descrita y constituye el mayor subgrupo en cuanto a distribución geográfica se refiere. Los productores de OXA-24 son particularmente predominantes en la península Ibérica, Asia, Estados Unidos, España y Portugal. Y el OXA-58 en aislados de Europa, pero también se han reportado hallazgos en países sudamericanos como Bolivia, Brasil y Argentina ^(43,48).

Las carbapenemasas de tipo OXA se encuentran presentes a nivel mundial, ya que, en algunos casos, la movilización de los genes bla_{OXA} está determinada por la presencia de secuencias de inserción y transposones, lo cual les confiere un alto potencial de diseminación. Además, las secuencias de inserción pueden resultar en secuencias promotoras híbridas relacionadas con el aumento de expresión de estos genes, lo que representa un mecanismo de resistencia a los carbapenémicos, o por lo menos una susceptibilidad reducida ⁽⁵⁶⁾.

IV.2.1.2. Mecanismos de resistencia no enzimáticos

Los mecanismos no enzimáticos que contribuyen a la resistencia a fármacos betalactámicos incluyen bombas de eflujo, la modificación de las proteínas de membrana externa denominados OMPs; así como, variación en la expresión de proteínas de unión a penicilinas ^(49,57).

A. Modificaciones en proteínas de membrana externa

Uno de los principales tipos de proteínas de membrana externa (OMP) lo constituyen las porinas, que forman canales que atraviesan la membrana y permiten el movimiento de pequeñas moléculas como nutrientes y antibióticos ^(23,46).

Es poca la información sobre estas proteínas en *Acinetobacter baumannii*, sin embargo, se han descrito aislamientos clínicos resistentes a betalactámicos, por la pérdida de estas proteínas de membrana ^(46,49). La OMP de mayor relevancia en *Acinetobacter* es la Heat Modifiable Protein (HMP) que permite la difusión de azúcares y betalactámicos ⁽⁴⁹⁾.

Además, se ha demostrado que la pérdida de la proteína externa de 29 kDa, conocida como CarO, está asociada con la resistencia a Imipenem. También se han reportado aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos por la disminución de la expresión de OMPs de 47-, 44-, y 37- kDa y la disminución de la expresión de OMPs de 22- y 33- kDa en asociación con OXA-24 ^(23,46).

B. Bombas de eflujo

Son proteínas transportadoras que permiten la captación de nutrientes, procesos de comunicación celular, y expulsión de residuos del metabolismo bacteriano. En *A. baumannii* se ha logrado identificar una serie de transportadores de membrana pertenecientes a 6 superfamilias: Proteínas dependientes de Adenosín Trifosfato (ABC), Proteínas de extrusión de compuestos tóxicos y de múltiples fármacos (MATE), Proteínas de resistencia múltiple a fármacos pequeños (SMR), Superfamilia de Facilitadores Principales (MFS), Superfamilia Resistencia – Nodulación - División (RND) y Superfamilia de eflujo de compuestos antimicrobianos proteobacterianos (PACE) ^(23,46).

La bomba de eflujo AdeABC, de la familia RND, está involucrada en la resistencia antimicrobiana en cepas de *Acinetobacter baumannii*. Este sistema tiene como sustratos a betalactámicos, aminoglucósidos, eritromicina, cloranfenicol, tetraciclinas, fluoroquinolonas, trimetoprima, tigeciclina. Las cepas sensibles que contienen los genes que codifican AdeABC pueden producir espontáneamente mutaciones de resistencia en los genes *adeS* y *adeR*, que regulan la expresión de AdeABC, provocando la sobreexpresión de la bomba. En consecuencia, se ha demostrado que la regulación del gen *AdeABC* disminuye la sensibilidad a múltiples clases de antimicrobianos en *Acinetobacter baumannii*, incluso carbapenémicos ^(46,49).

C. Alteración de la Proteína de unión a Penicilina (PBP)

Las PBPs son esenciales para la síntesis de la pared bacteriana durante la división celular, y éstas son diana de las betalactamasas. La resistencia a betalactámicos se desarrolla mediante la alteración de las PBPs, de forma que las bacterias pueden disminuir la afinidad por el antibiótico mediante la variación del número o por la modificación estructural de las PBPs ^(46,48).

La resistencia a carbapenemas por *Acinetobacter baumannii* se ha relacionado a la reducción de la expresión de PBPs y al aumento de la expresión de una PBP de 24 KDa. La ausencia de la PBP2a está relacionada a una baja resistencia a fármacos carbapenémicos como Imipenem y/o meropenem; mientras que la ausencia de PBP2a y PBP2b de manera simultánea, está asociada a niveles mayores de resistencia ^(46,48,49).

V. METODOLOGÍA

El presente proyecto de investigación fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación del Hospital Nacional Hipólito Unanue, mediante la carta N° 034-2021-CIEI-HNHU (Anexo 01).

La recolección, identificación bioquímica y susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *A. baumannii*, se realizaron en el Laboratorio Clínico del Hospital Nacional Hipólito Unanue. La preservación y reactivación de cepas, detección fenotípica de carbapenemasas, extracción de ADN, identificación molecular y la detección genotípica se realizaron en las instalaciones del laboratorio del Departamento académico de Microbiología y Parasitología básica y aplicada, provisto con los materiales, reactivos y equipos necesarios para el desarrollo del presente proyecto (Anexo 02); ubicado en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, la cual se encuentra licenciada por SUNEDU, acreditada por SINEACE, y certificada con ISO 9001:2008 por BEREAU VERITAS.

V.1. Tipo de estudio:

Observacional, descriptivo y transversal.

V.2. Material Biológico:

- ✓ Sangre desfibrinada estéril

Cepas Control:

- ✓ *Acinetobacter baumannii* – cepa clínica (metalobetalactamasa positivo)
- ✓ *Acinetobacter baumannii* – cepa clínica (carbapenemasa positiva)
- ✓ *Acinetobacter baumannii* – cepa clínica (carbapenemasa negativo).
- ✓ *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606
- ✓ *Acinetobacter spp*- no baumannii – cepa clínica (control negativo).
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922.

Cepas de Estudio:

- ✓ Cepas clínicas resistentes a carbapenémicos aisladas en el Hospital Nacional Hipólito Unanue, Lima – Perú durante el período agosto a diciembre del 2019.

V.3. Procedimientos

V.3.1 Recolección de muestras

Se recolectaron un total de 40 cepas clínicas resistentes a carbapenémicos del Hospital Nacional Hipólito Unanue en el periodo de agosto – diciembre 2019, e identificadas como *Acinetobacter baumannii*, las cuales fueron conservadas en crioviales con Caldo Trypticase Soya y glicerol 20 % a una temperatura de -20 °C.

V.3.2 Identificación de cepas

V.3.1.1. Tinción Gram

Realizado en el Hospital Nacional Hipólito Unanue según el método de Cappuccino y Sherman ⁽⁵⁸⁾.

V.3.1.2. Pruebas bioquímicas

Realizado en Hospital Nacional Hipólito Unanue mediante las pruebas de oxidasa, catalasa, agar citrato de Simmons, agar triple azúcar – hierro (TSI) y movilidad según el método de Cappuccino y Sherman ⁽⁵⁸⁾.

A. Prueba de Oxidasa

Se prepararon placas con Agar Trypticase Soya posteriormente se sembraron las cepas de *Acinetobacter baumannii* por 24 horas a 37 °C. Posteriormente se tomó una colonia y se colocó sobre un papel filtro, se agregó 10 gotas de reactivo (dihidrocloreto de N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilendiamina), el objetivo de esta prueba fue la de detectar la presencia de la enzima citocromo oxidasa, para *Acinetobacter baumannii* no se evidencia cambio de coloración ⁽⁵⁸⁾.

B. Prueba de Catalasa

Se prepararon placas con Agar Trypticase Soya posteriormente se sembraron las cepas de *Acinetobacter baumannii* por 24 horas a 37 °C. Posteriormente se tomó una colonia de cada cepa de *Acinetobacter baumannii* y se colocó sobre un porta objetos, se agregó 1 gota de agua oxigenada 10 volúmenes. En *Acinetobacter baumannii* se evidencia la liberación de oxígeno en forma de burbujas ⁽⁵⁸⁾.

C. Prueba de Agar Citrato de Simmons

Con un asa estéril se sembró mediante estrías cada cepa de *Acinetobacter baumannii* en tubos con Agar con citrato de Simmons inclinado, los cuales se incubaron a una temperatura de 37 °C por 24 horas, para *Acinetobacter baumannii* se evidencia crecimiento y coloración del medio. Esta prueba permitió observar si la cepa fue capaz de usar citrato como su única fuente de carbono, para *Acinetobacter baumannii* se observa coloración azul ⁽⁵⁸⁾.

D. Prueba del agar triple Azúcar – Hierro (TSI = Three sugar iron)

Se sembró cada cepa de *Acinetobacter baumannii* en superficie y profundidad en agar triple azúcar hierro, se incubaron a una temperatura de 37 °C por 24 horas, para *Acinetobacter baumannii* no se observa cambio de coloración ⁽⁵⁸⁾.

E. Movilidad: Medio de Motilidad – Indol – Ornitina (M.I.O.)

Para determinar si un organismo es móvil o inmóvil, se sembraron las cepas de *Acinetobacter baumannii* por punción a 2/3 de profundidad en el medio de Movilidad Indol Ornitina por 24 h a 37 °C. para *Acinetobacter baumannii* no se evidencia opalescencia o crecimiento difuso fuera del área de siembra ⁽⁵⁹⁾.

V.3.1.3. Crecimiento a 44 °C

Las cepas de *A. baumannii* se sembraron en Agar Tripticasa Soya, y se incubó 24 h a 44 °C, se observa la presencia de crecimiento bacteriano ⁽⁵⁸⁾.

V.3.1.4. Identificación molecular

A. Reactivación de cepas.

Las cepas de *Acinetobacter baumannii* crioconservadas se sembraron en Agar Sangre e incubaron a 37 °C por 24 horas para favorecer el crecimiento de la bacteria, luego las colonias se transfirieron al Agar Mac Conkey sembrando por agotamiento y luego se incubó a 37 °C por 24 horas ⁽²⁰⁾.

B. Extracción de ADN

El ADN cromosomal de las cepas se obtuvo mediante HiPura®Bacterial Genomic DNA purification Kit a partir de cepas activas de *Acinetobacter baumannii*⁽⁶⁰⁾. (ver Anexo 03).

La reactivación se realizó en TSB durante 24 h a 37 °C, luego se centrifugó 1,5 mL del inóculo bacteriano en un tubo eppendorff a 13 000 rpm durante 2 minutos, se desechó el sobrenadante y conservó el pellet.

Se resuspendieron los pellets con 180 µL de solución de lisis (AL) (DS0015). Se añadió 20 µL de la solución de Proteinasa K (20 mg/mL) a la muestra para la lisis celular, se homogenizó e incubó 30 minutos a 55 °C. Posteriormente se añadió 200 µL de solución de lisis (C1) (DS0010), y se agitó en el vórtex por unos 15 segundos y se incubó a 55 °C durante 10 minutos. Se añadió 200 µL de etanol absoluto al lisado y se homogenizó en vórtex durante unos 20 segundos. Posterior a la agitación, se trasvasó todo el contenido incluyendo el precipitado en la columna de centrifugado HiElute Miniprep. Centrifugar a 10000 rpm durante 1 minuto, se eliminó el sobrenadante, se añadió 500 µL de la solución de prelavado a la columna y se centrifugó a 10000 rpm por 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante, seguido se añadió 500 µL de la solución de lavado diluida (WS) (DS0012) a la columna y se procedió a centrifugar por 3 minutos a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante y se centrifugó a la misma velocidad por 1 minuto adicional para secar la columna. Se transfirió la columna de centrifugado HiElute Miniprep a un tubo de recolección nuevo sin tapar. Se pipeteó 200 µL del tampón de elución (ET) (DS0040) directamente en la columna, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se centrifugó a 10000 rpm durante 1 minuto para eludir el ADN. Se transfirió el eluido a un tubo de recolección de 2 mL recién tapado para almacenar. Ver figura 3.

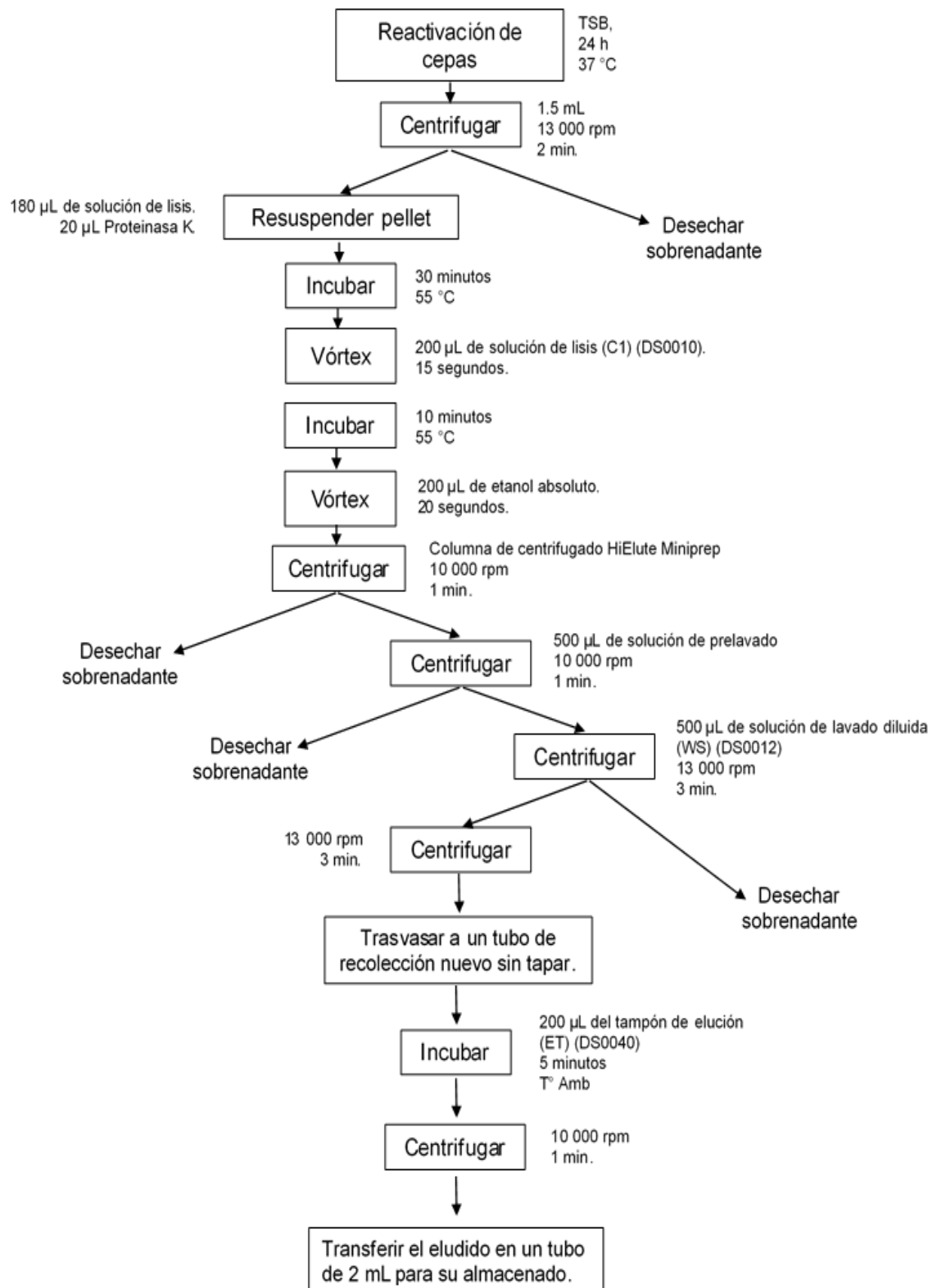


Figura 3. Extracción de ADN por HiPura®Bacterial Genomic DNA purification Kit.

Fuente: Elaboración propia basado en HiPura®Bacterial Genomic DNA purification Kit ⁽⁶⁰⁾.

C. Amplificación de gen *recA* y la región ITS

Se amplificó el gen *recA* y la región ITS por la reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR múltiple), se utilizó los primers según tabla 1:

Tabla 1. Primers empleados en la identificación del gen *recA* y la región ITS en *A. baumannii*

PRIMER	SECUENCIA	PRODUCTO
P-rA1	5'-CCTGAATCTTCTGGTAAAAC	425 pb
P-rA2	5'-GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC	
P-Ab-ITSF	5'-CATTATCACGGTAATTAGTG	208 pb
P-Ab-ITSR	5'-AGAGCACTGTGCACTTAAG	

Fuente: Elaboración propia basado en Chen (2007) ⁽⁴⁴⁾ & Bocanegra (2013) ⁽⁴³⁾.

Las condiciones de amplificación para el gen *recA* y la región ITS se detallan en la tabla 2.

Tabla 2 Condiciones de amplificación para el gen *recA* y la región ITS

PROCESO	CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización Inicial	01	94 °C	5 minutos
Desnaturalización	30	94 °C	30 segundos
Alineación	01	55 °C	30 segundos
Amplificación	01	72 °C	30 segundos
Elongación final	01	72 °C	7 minutos

Fuente: Elaboración propia basado en Chen (2007) ⁽⁴⁴⁾ & Bocanegra (2013) ⁽⁴³⁾.

V.3.3 Detección fenotípica

V.3.3.1. Susceptibilidad antimicrobiana

Realizado en el Hospital Nacional Hipólito Unanue siguiendo el método de disco de difusión ⁽⁶¹⁾, interpretado por Clinical and Laboratory Standards Institute 2018 M100-ED28 ⁽⁶²⁾ (ver Anexo 04).

V.3.3.2. Blue Carba

El Blue Carba Test se realizó usando el Protocolo del Servicio Antimicrobianos, Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” Adaptado de Pires J. y cols ⁽⁶³⁾.

Se cultivaron las cepas de *Acinetobacter baumannii* en agar Mueller-Hinton y se dejaron incubar por 24 h a 37 °C. Posteriormente, se prepararon las soluciones de trabajo: 100 mL de solución A (Azul de bromotimol al 0,04% y 0,1 mmol/litro de ZnSO₄) y 100 mL de solución B (Azul de bromotimol al 0.04% y 0,1 mmol/litro de ZnSO₄ y 6 mg de Tienam MSD, equivalente a 3 mg de Imipenem), finalmente se ajustaron a un pH final de 7,0.

En una microplaca de 96 pocillos se procedió a inocular las cepas con un asa de siembra descartable de 5 µL, en un pocillo con 100 µL de solución A (pocillo control) y en otro con 100 µL de solución B (pocillo reacción). Se incubó por 2 horas a 37 °C, realizando una leve agitación y anotando los cambios de coloración cada 30 minutos.

V.3.3.3. eCIM

La presencia de oxacilinasas y metalobetalactamasas se determinó siguiendo el método de inactivación de carbapenémicos modificado con EDTA descrito por la Sociedad Americana de Microbiología ⁽⁶⁴⁾.

Se cultivó cada cepa de *Acinetobacter baumannii* en agar Mueller – Hinton y se incubó a 37 °C durante 24 h. Con un asa de siembra descartable de 10 uL se tomó de una a dos colonias del cultivo y realizó la suspensión de cada cepa en tres tubos eppendorff con 2 mL de Caldo Soya Trypticase, el primer tubo sin EDTA, el segundo tubo con EDTA 0,1 mM y el tercer tubo con EDTA 0,5 mM. Posteriormente, se colocó un disco de 10 µg Meropenem en cada tubo eppendorff, se incubaron a 37 °C por 2 horas. Después de la incubación, se colocó cada disco en una placa con Agar Mueller – Hinton previamente inoculada con una cepa de *E. coli* ATCC 25922 a una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland y se incubó a 35 °C por 24 horas.

V.3.3.4. Sinergismo de doble disco con EDTA

La prueba de sinergia de doble disco se realizó utilizando monodiscos de EDTA/SMA de laboratorios Britania ⁽⁶⁵⁾.

Las cepas de *A. baumannii* se sembraron en agar tripticasa soya, se incubaron por 24 h a 37 °C, luego se suspendió en solución salina 0,9 % hasta alcanzar una equivalencia al tubo 0,5 en la escala McFarland, inmediatamente se sembró por hisopado en una placa de agar Mueller-Hinton. Después del secado, se colocaron discos de Imipenem, EDTA/SMA y meropenem, separados en 10 mm de borde a borde (ver figura), se incubaron a 37 °C por 24 horas, se reportó como positivo la deformidad en los halos de inhibición, simulando la forma de huevo. Ver figura 4.

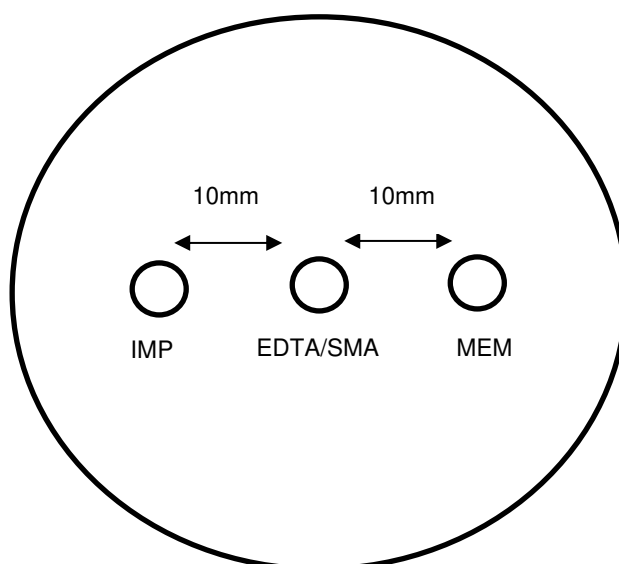


Figura 4. Prueba de sinergismo de doble disco con EDTA.

Fuente: Elaboración propia.

V.3.4 Detección Genotípica

V.3.4.1. Carbapenemasas clase D: Tipo OXA

Se amplificaron los genes de las familias bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-24-like}, bla_{OXA-51-like} y bla_{OXA-58-like}, codificantes de Oxacilinasas (OXA), por reacción en cadena de la polimerasa múltiple (PCR múltiple) ^(66,67). Ver tabla 3.

Tabla 3 Primers empleados en la identificación de genes bla_{OXA} en *A. baumannii*

PRIMER	SECUENCIA	TAMAÑO DE LOS PRODUCTOS
OXA-23 F	5'-GATCGGATTGGAGAACCAGA	501 pb
OXA-23 R	5'-ATTTCTGACCGCATTTCAT	
OXA-24 F	5'-GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	246 pb
OXA-24 R	5'-AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	
OXA-51 F	5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG	353 pb
OXA-51 R	5'-TGGATTGCACTTCATCTTGG	
OXA-58 F	5'-AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599 pb
OXA-58 R	5'-CCCCTCTGCGCTCTACATAC	

Fuente: Elaboración propia basado en Handal (2017) ⁽⁶⁶⁾ & Mostachio (2009) ⁽⁶⁷⁾.

Las condiciones de amplificación para OXAs se indican en la tabla 4.

Tabla 4 Condiciones de amplificación para los genes bla_{OXA} en *A. baumannii*

PROCESO	CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización Inicial	01	94 °C	5 minutos
Desnaturalización	33	94 °C	25 segundos
Alineación	01	53 °C	40 segundos
Amplificación	01	72 °C	50 segundos
Elongación final	01	72 °C	6 minutos

Fuente: Elaboración propia basado en Handal (2017) ⁽⁶⁶⁾ & Mostachio (2009) ⁽⁶⁷⁾.

V.3.4.2. Carbapenemasas clase B: Tipo IMP y VIM

En la identificación de genes codificantes de metalobetalactamasas se empleó los primers descritos por Bocanegra para IMP y VIM, por reacción en cadena de la polimerasa simple (PCR simple) ⁽⁴³⁾. Ver tabla 5

Tabla 5 Primers empleados en la identificación de genes *blavIM* y *blaIMP* en *A. baumannii*

PRIMER	SECUENCIA	TAMAÑO DE LOS PRODUCTOS
IMP-F	5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	188 pb
IMP-R	5'-CCAAACYACTASGTTATCT	
VIM-F	5'-ATGGTGTTTGGTCGCATATC	510 pb
VIM-R	5'-TGGGCCATTTCAGCCAGATC	

Fuente: Elaboración propia basado en Bocanegra (2013) ⁽⁴³⁾.

Las condiciones de amplificación para IMP se indican en la tabla 6.

Tabla 6 Condiciones de amplificación para el gen *blaIMP* en *A. baumannii*

PROCESO	CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización Inicial	01	94 °C	5 minutos
Desnaturalización	30	94 °C	30 segundos
Alineación	01	52 °C	40 segundos
Amplificación	01	72 °C	50 segundos
Elongación final	01	72 °C	5 minutos

Fuente: Elaboración propia basado en Bocanegra (2013) ⁽⁴³⁾.

Las condiciones de amplificación para VIM se indican en la tabla 7.

Tabla 7 Condiciones de amplificación para el gen *blavIM* en *A. baumannii*

PROCESO	CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización Inicial	01	94 °C	5 minutos
Desnaturalización	30	94 °C	25 segundos
Alineación	01	60 °C	40 segundos
Amplificación	01	72 °C	50 segundos
Elongación final	01	72 °C	5 minutos

Fuente: Elaboración Propia basado en Bocanegra (2013) ⁽⁴³⁾.

Los amplicones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1,7 % con fluorescent dye reagent 6X (Geneon) a 50 V en 60 minutos.

VI. RESULTADOS

VI.1. Identificación y procedencia de cepas

Se recolectaron 40 cepas resistentes a carbapenémicos identificadas como *A. baumannii*, crioconservadas en TSA, en el Hospital Nacional Hipolito Unanue, Lima – Perú durante el período agosto a diciembre del 2019 (Ver Anexo 05).

Los aislamientos se recolectaron de diferentes áreas hospitalarias (ver figura 5): Unidad de cuidados intensivos (30%), medicina general (22,5 %), obstetricia (17,5 %), cirugía general (15 %), neumología (10 %), cirugía torácica (2,5 %) y pediatría (2,5 %).

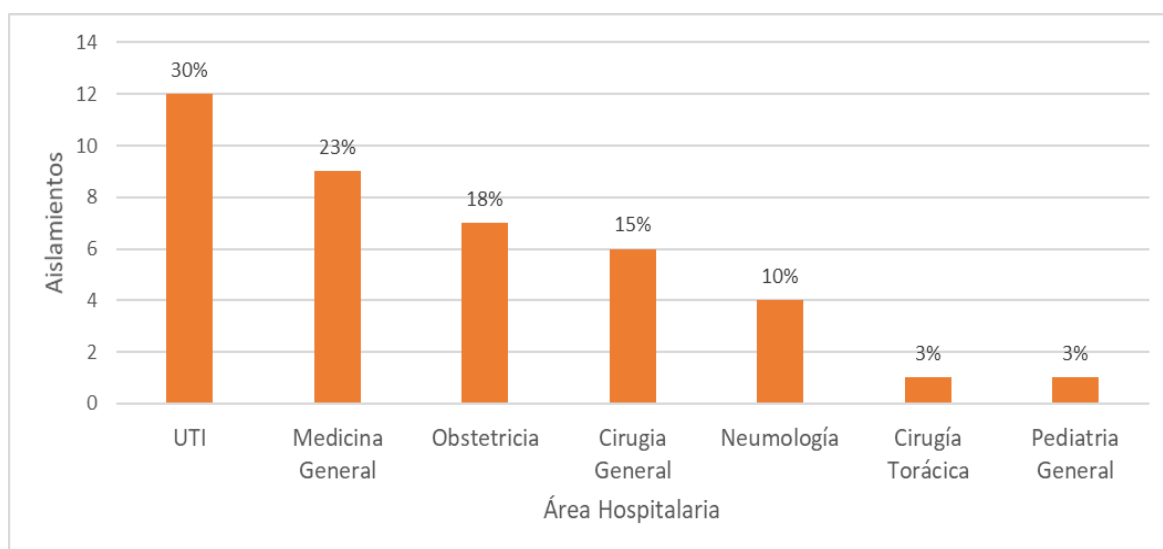


Figura 5. Procedencia de aislados de *Acinetobacter baumannii* por área hospitalaria

Los aislamientos analizados se obtuvieron de muestras de secreciones (bronquiales 47,5 %, líquido cefalorraquídeo 12,5 %, heridas 7,5 %, liquido pleural 75 %, punta de catéter central 7,5 %, liquido ascítico 7,5 %, traqueal 2,5 %, y esputo 2,5 %), sangre (2,5 %) y orina (2,5 %), ver figura 6.

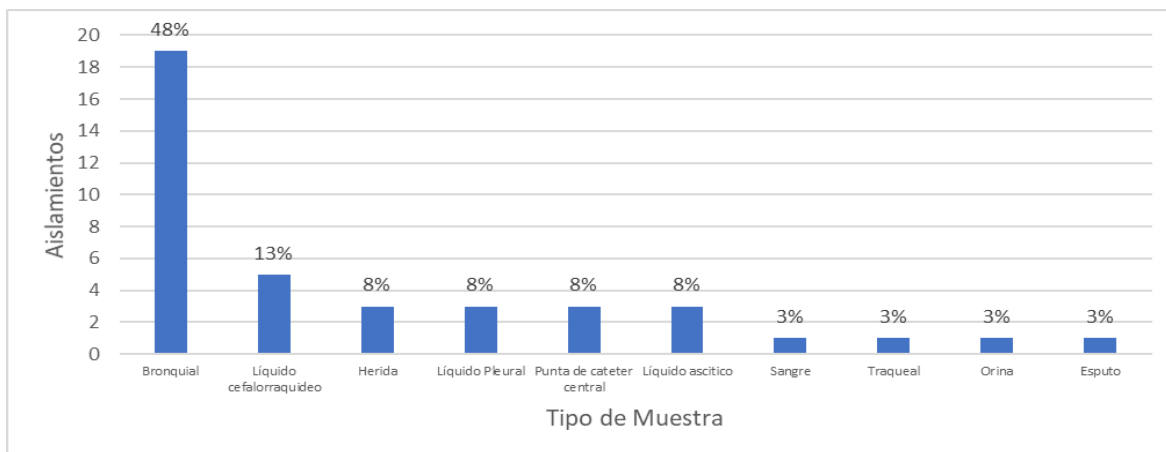


Figura 6. Procedencia de aislados de *Acinetobacter baumannii* por tipo de muestra analizada.

Según etapas de vida, las cepas aisladas fueron detectados en mayor número en pacientes adultos de 39 a 59 años (43 %), luego en adulto mayor de 60 años a más (38 %), jóvenes de 18 a 29 años (18 %) y en niños de 0 a 11 años (3 %). Según se observa en la figura 7.

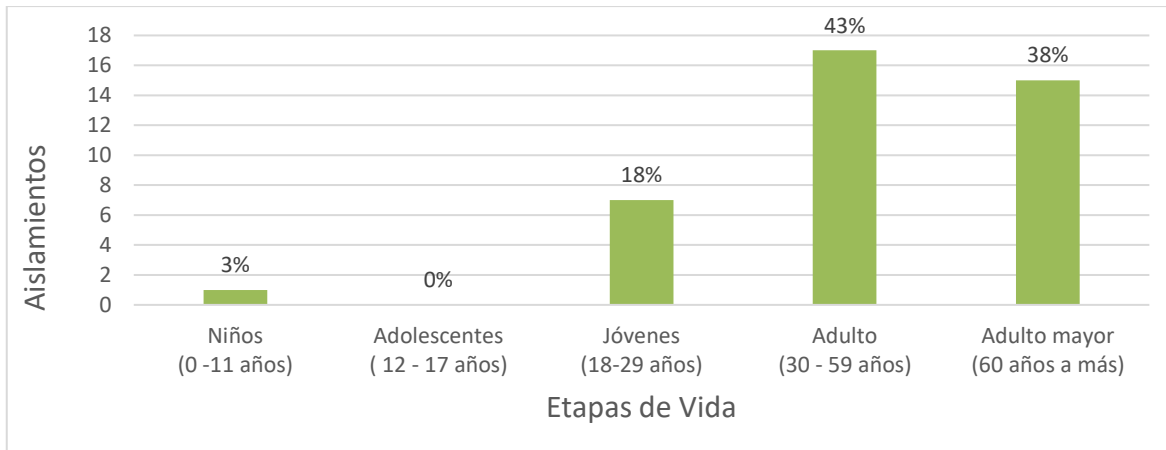


Figura 7. Procedencia de aislados de *Acinetobacter baumannii* por etapas de vida de los pacientes.

VI.1.1. Identificación molecular

La detección gen *recA* y la región ITS en las 40 cepas de *Acinetobacter baumannii* se realizó a través del PCR múltiple, encontrando que 40/40 (100 %) cepas portaban ambos genes (Ver tabla 8, figuras 8 y 9).

Tabla 8. Detección molecular por PCR múltiple del gen *recA* y la región ITS en cepas de *A. baumannii*.

Gen	N° de aislamientos (n=40)	Prevalencia
recA	40	100 %
ITS	40	100 %

Fuente: Elaboración Propia

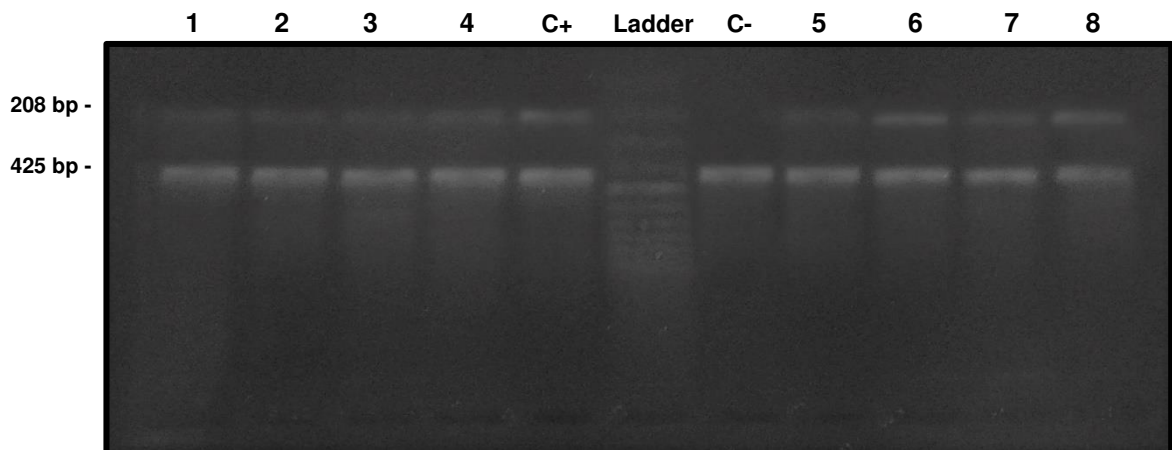


Figura 8. Electroforesis de PCR múltiple para el gen *recA* y la región ITS en cepas de *A. baumannii*. C+: Control positivo (*Acinetobacter baumannii* ATCC 19606). C-: Control negativo (*Acinetobacter spp* -No *baumannii*). Muestra aba-1, aba-2, aba-3, aba-4, aba-5, aba-6, aba-7 y aba-8: Positivo para gen *recA* y una región ITS.

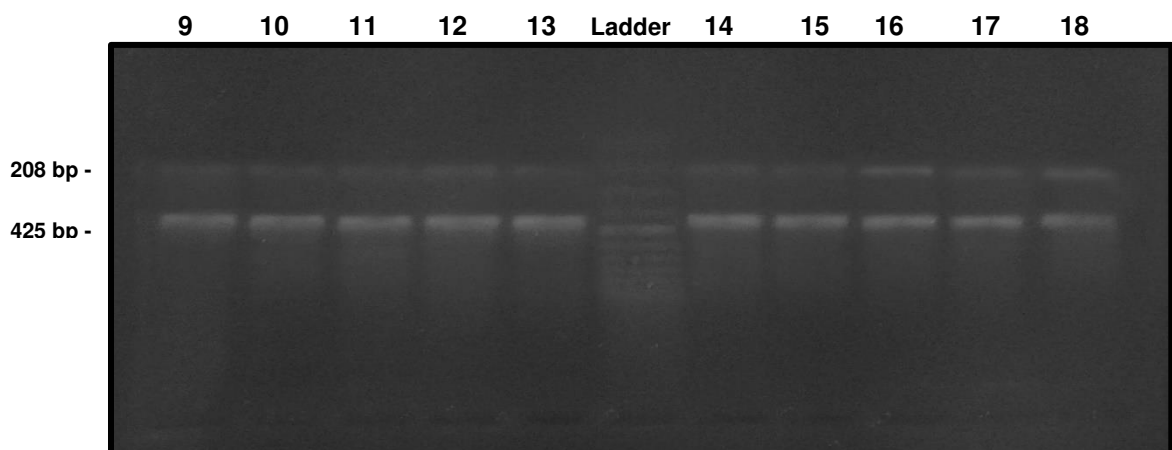


Figura 9. Electroforesis de PCR múltiple para el gen *recA* y la región ITS en cepas de *A. baumannii*. Muestra *aba-9*, *aba-10*, *aba-11*, *aba-12*, *aba-13*, *aba-14*, *aba-15*, *aba-16*, *aba-17* y *aba-18*: Positivo para gen *recA* y una región ITS.

VI.2. Detección fenotípica de carbapenemasas

VI.2.1. Blue Carba

La detección fenotípica de enzimas carbapenemasa, según el método Blue Carba fue positiva en las 40 cepas de *A. baumannii*, 9 cepas reaccionaron dentro de los primeros 30 minutos, luego 3 cepas entre los minutos 30 y 60, 18 cepas entre los 60 y 120 min, y 10 cepas entre los 120 y 150 minutos. Según se observan en figuras 10 - 14.

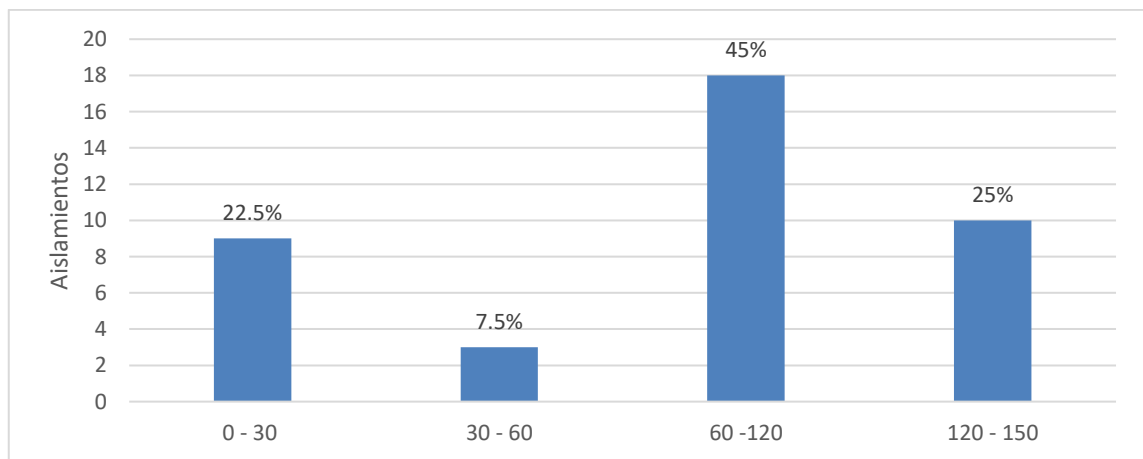


Figura 10. Resultados Prueba Blue Carba por lapso de tiempo.

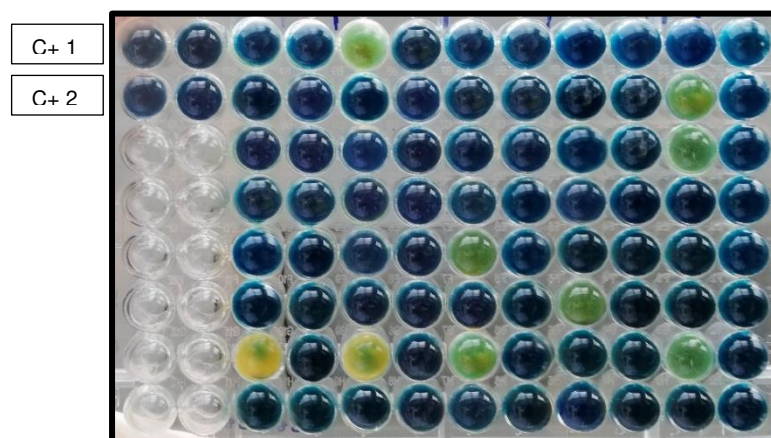


Figura 11. Prueba Blue Carba: 30 minutos. C+1: *A. baumannii* carbapenemasa positiva. C+2: *A. baumannii* metalobetalactamasa positiva.

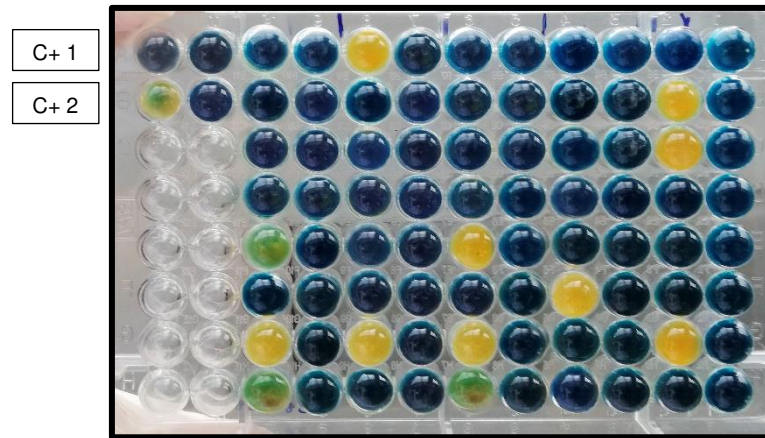


Figura 12. Prueba Blue Carba: 60 minutos. C+1: *A. baumannii carbapenemasa* positiva. C+2: *A. baumannii metalobetalactamasa* positiva.



Figura 13. Prueba Blue Carba: 120 minutos. C+1: *A. baumannii carbapenemasa* positiva. C+2: *A. baumannii metalobetalactamasa* positiva.



Figura 14. Prueba Blue Carba: 150 minutos. C+1: *A. baumannii carbapenemasa* positiva. C+2: *A. baumannii metalobetalactamasa* positiva.

VI.2.2.eCIM

En la detección fenotípica de carbapenemasas según el método eCIM realizadas a las 40 cepas de *A. baumannii* se obtuvo que el 100 % (40/40) de las cepas no presentaban halo de inhibición en el segmento A, y que el 7,5 % (3/40) presentó halo en los segmentos B y C. según se observa en figuras 15 - 20.

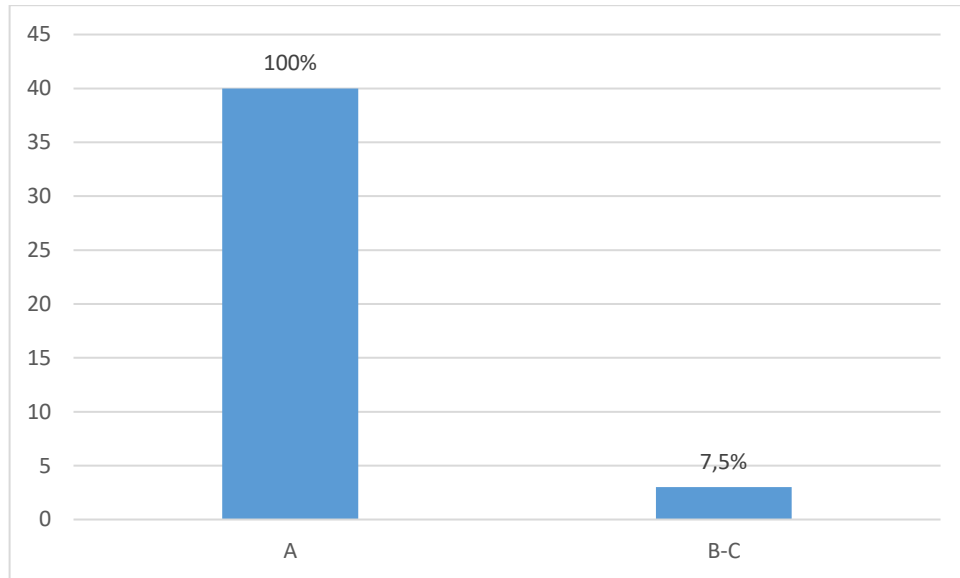


Figura 15. Resultados Prueba eCIM por segmentos.

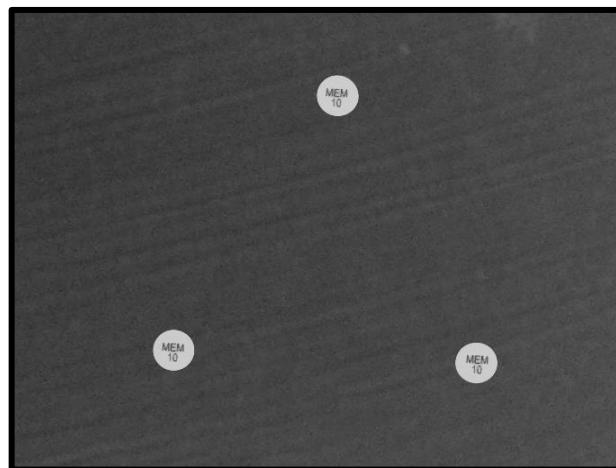


Figura 16. Prueba eCIM: Control Positivo (*Acinetobacter baumannii* carbapenemasa positivo)

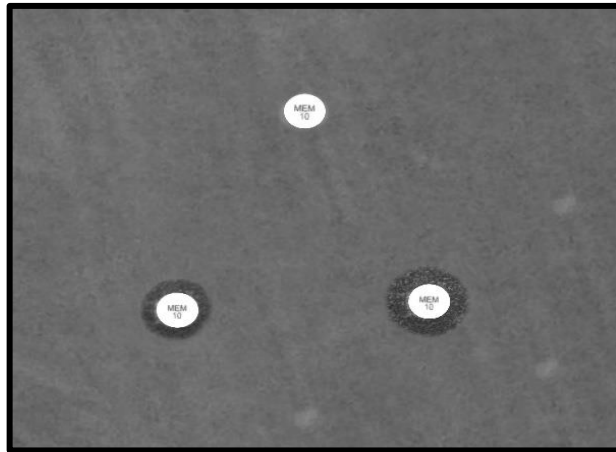


Figura 17. Prueba eCIM: Control Positivo (*Acinetobacter baumannii* metallobetalactamasa positiva)

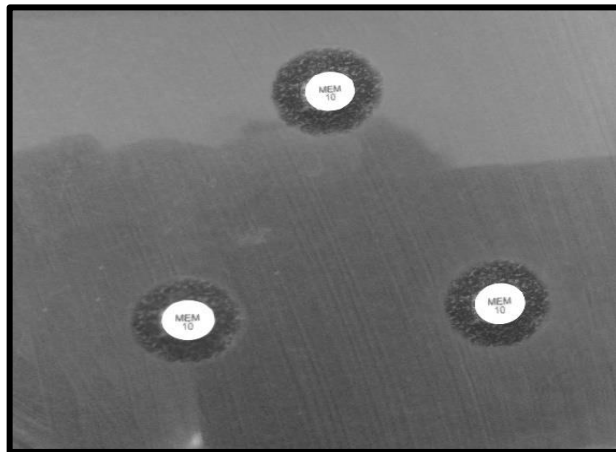


Figura 18. Prueba eCIM: Control negativo (*Acinetobacter baumannii* carbapenemasas negativa)

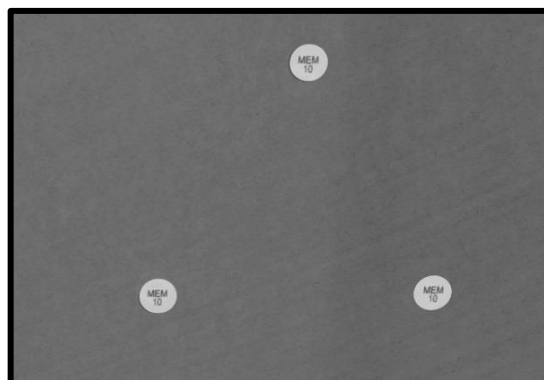


Figura 19. Prueba eCIM: Muestra Aba-17 (cepa productora de carbapenemasas)

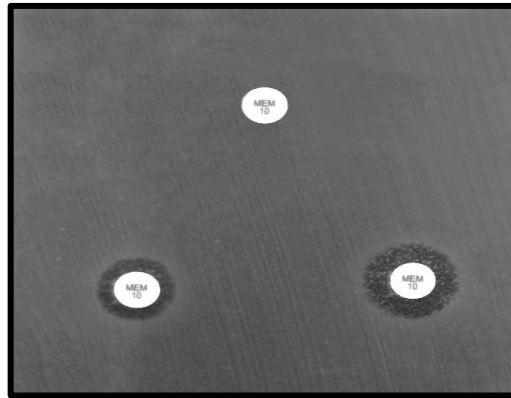


Figura 20. Prueba eCIM: Muestra Aba-31 (cepa productora de metallobetalactamasa)

VI.2.3. Sinergismo doble disco con EDTA

En la detección fenotípica de carbapenemasas según el método de Sinergismo de doble disco con EDTA realizadas a las 40 cepas de *A. baumannii* se obtuvo que 3 cepas (7,5 %) presentaron halo de inhibición en la zona de intersección de los discos. Ver figuras 21 - 24.

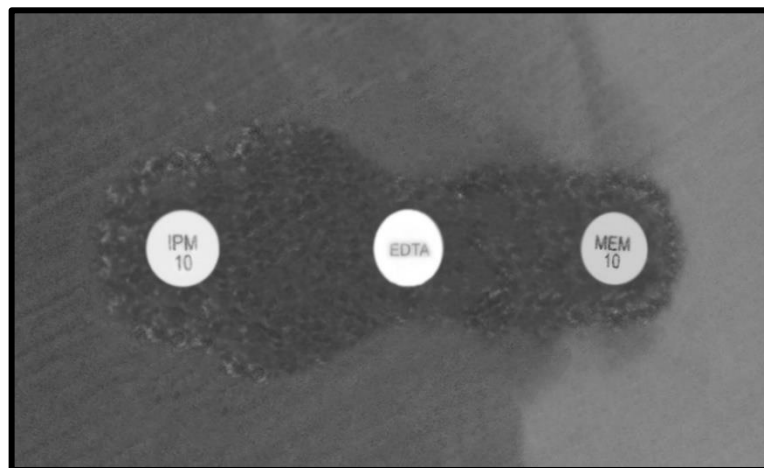


Figura 21. Prueba Sinergismo doble disco con EDTA: Control Positivo (*Acinetobacter baumannii* metallobetalactamasa positiva)

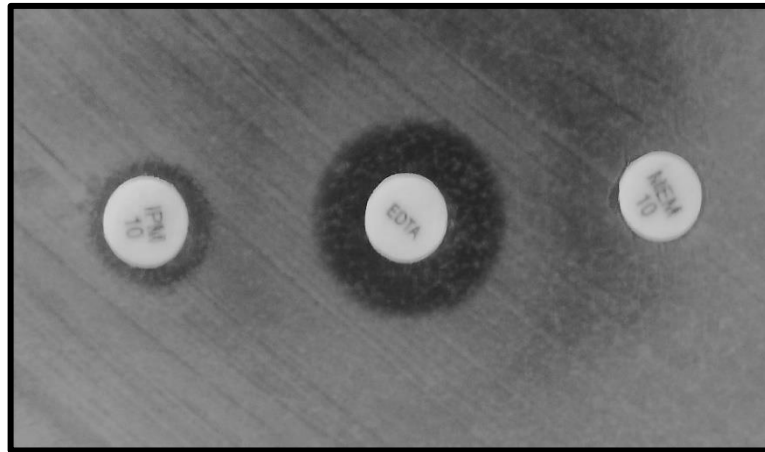


Figura 22. Prueba Sinergismo doble disco con EDTA: Control Negativo (*Acinetobacter baumannii* metalobetalactamasa negativa)

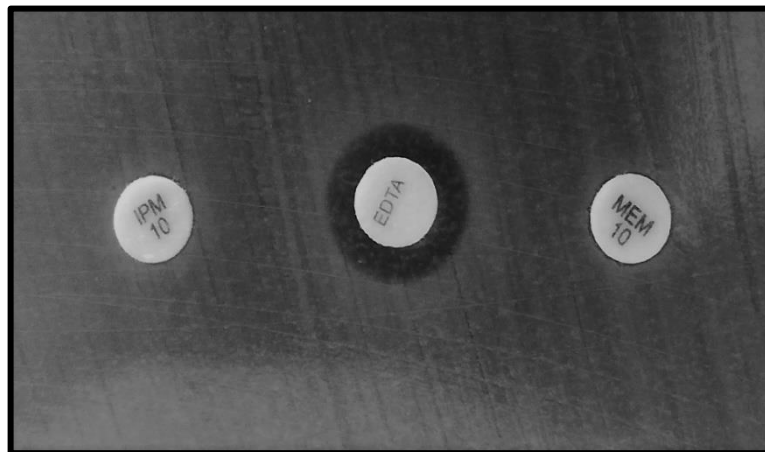


Figura 23. Prueba Sinergismo doble disco con EDTA. Muestra Aba-26 cepa productora de carbapenemasas

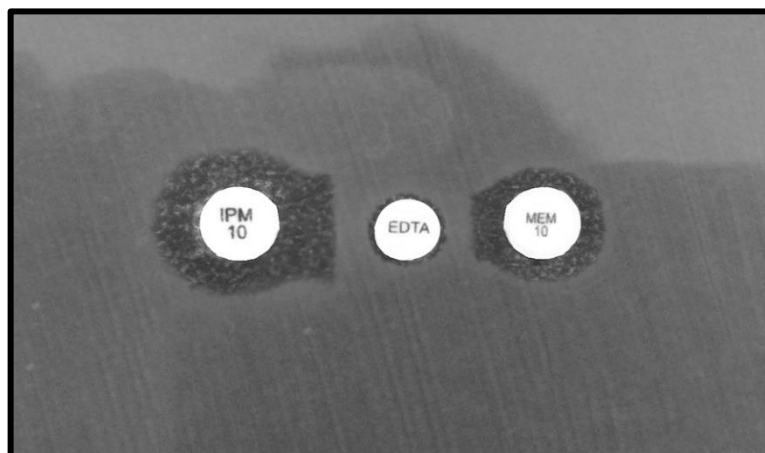


Figura 24. Prueba Sinergismo doble disco con EDTA. Muestra Aba-7 (cepa productora de metalobetalactamasa)

VI.3. Detección genotípica de carbapenemasas

VI.3.1. Detección genotípica de Oxacilinasas.

La detección de genes codificantes de oxacilinasas (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like} y *bla*_{OXA-58-like}) en las 40 cepas estudiadas reveló que 40/40 (100%) portaban genes codificantes de Oxacilinasas. Entre ellos 40/40 (100 %) portaban el gen *bla*_{OXA-51-like}, el 29/40 (72,5 %) el gen *bla*_{OXA-24-like} y el 14/40 (35 %) *bla*_{OXA-23-like}. No se detectó la presencia del gen *bla*_{OXA-58-like}. Adicionalmente se detectó la presencia simultánea de genes codificantes para OXA-51 y OXA-24 en 25/40 (62,5 %), OXA-51 y OXA-23 en 10 (25 %) y OXA-51, OXA-23 y OXA-24 en 4/40 (10 %) de las cepas estudiadas (Anexo 07).

Se determinó la prevalencia de los genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-51-like}, y *bla*_{OXA-58-like} en las cepas de estudio (Ver tabla 9 y 10; y figuras 25 - 28).

TABLA 9. Detección molecular por PCR múltiple de genes *bla*_{oxa-23-like}, *bla*_{oxa-24-like}, *bla*_{oxa-51-like}, *bla*_{oxa-58-like} en cepas de *A. baumannii*.

Gen	Nº de aislamientos (n=40)	Prevalencia
<i>bla</i>_{oxa-51-like}	40	100 %
<i>bla</i>_{oxa-24-like}	29	72,5 %
<i>bla</i>_{oxa-23-like}	14	35 %
<i>bla</i>_{oxa-58-like}	0	0 %

Fuente: Elaboración Propia

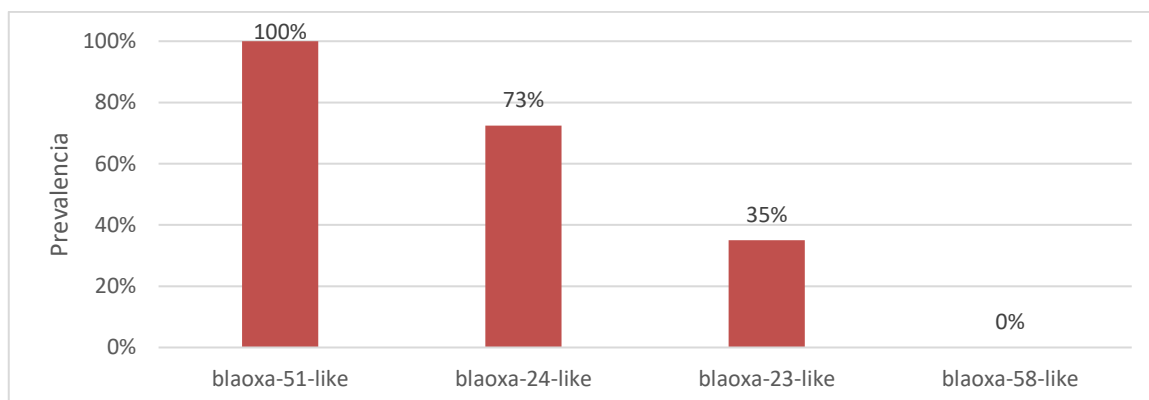


Figura 25. Prevalencia de genes bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-24-like}, bla_{OXA-51-like}, bla_{OXA-58-like} en cepas de *A. baumannii*.

Tabla 10. Presencia simultánea de genes bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-24-like}, bla_{OXA-51-like}, bla_{OXA-58-like} en cepas de *A. baumannii*.

Gen	N° de aislamientos (n=40)	Prevalencia
bla_{OXA-51-like} y bla_{OXA-24-like}	25	62,5 %
bla_{OXA-51-like} y bla_{OXA-23-like}	10	25 %
bla_{OXA-23-like}, bla_{OXA-23-like} y bla_{OXA-23-like}	4	10 %

Fuente: Elaboración Propia

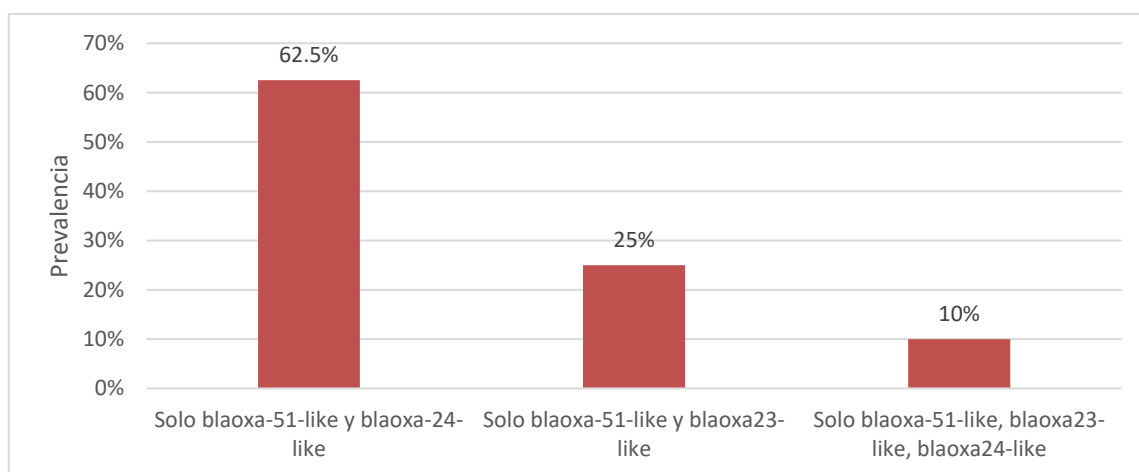


Figura 26. Prevalencia de dos o más genes en cepas de *A. baumannii*.

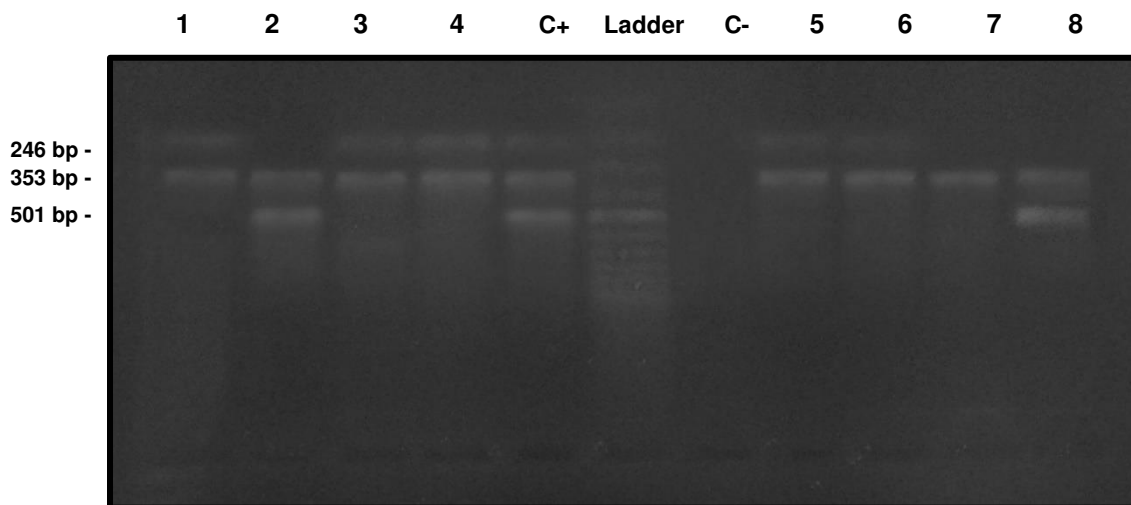


Figura 27. Electroforesis de PCR múltiple de genes *bla_{oxa}-23-like*, *bla_{oxa}-24-like*, *bla_{oxa}-51-like*, *bla_{oxa}-58-like* en cepas de *A. baumannii*. C+: Control positivo C-: Control negativo. Muestra aba-1, aba-3, aba-4, aba-5 y aba-6: Positivo para gen *bla_{oxa}-24-like*, *bla_{oxa}-51-like*. Muestra aba-2 y aba-8: Positivo para gen *bla_{oxa}-23-like*, *bla_{oxa}-51-like*. Muestra aba-7: Positivo para gen *bla_{oxa}-51-like*.

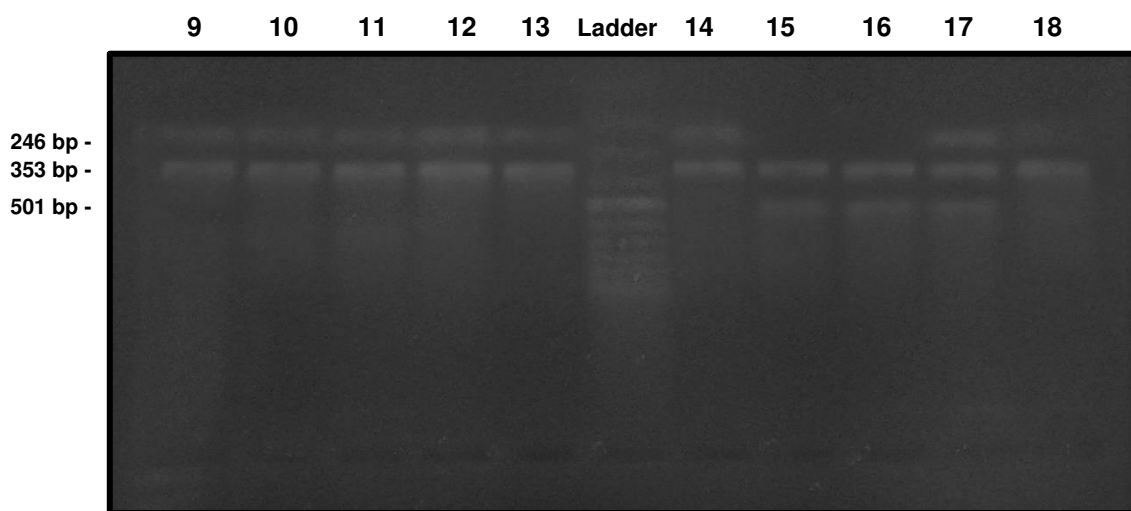


Figura 28. Electroforesis de PCR múltiple de genes *bla_{oxa}-23-like*, *bla_{oxa}-24-like*, *bla_{oxa}-51-like*, *bla_{oxa}-58-like* en cepas de *A. baumannii*. Muestra aba-9, aba-10, aba-11, aba-12, aba-13, aba-14 y aba-18: Positivo para gen *bla_{oxa}-24-like*, *bla_{oxa}-51-like*. Muestra 15 y 16: Positivo para gen *bla_{oxa}-23-like*, *bla_{oxa}-51-like*. Muestra aba-17: Positivo para gen *bla_{oxa}-23-like*, *bla_{oxa}-24-like*, *bla_{oxa}-51-like*.

VI.3.2. Detección genotípica de Metalobetalactamasas.

La detección de genes codificantes de Metalobetalactamasas (bla_{IMP} y bla_{VIM}) en las 40 cepas de *A. baumannii*, reveló que 2/40 (5 %) cepas portaban el gen bla_{IMP} . No se evidenció presencia del bla_{VIM} (Anexo 07).

Se determinó la prevalencia de los genes bla_{IMP} y bla_{VIM} en las cepas recolectadas durante el periodo de estudio. (Ver tabla 11 y 12; y figuras 29 - 32).

Tabla 11. Detección molecular por PCR simple del gen bla_{IMP} y bla_{VIM} en cepas de *A. baumannii*.

Gen	N° de aislamientos (n=40)	Prevalencia
bla_{IMP}	2	5 %
bla_{VIM}	0	0 %

Fuente: Elaboración Propia

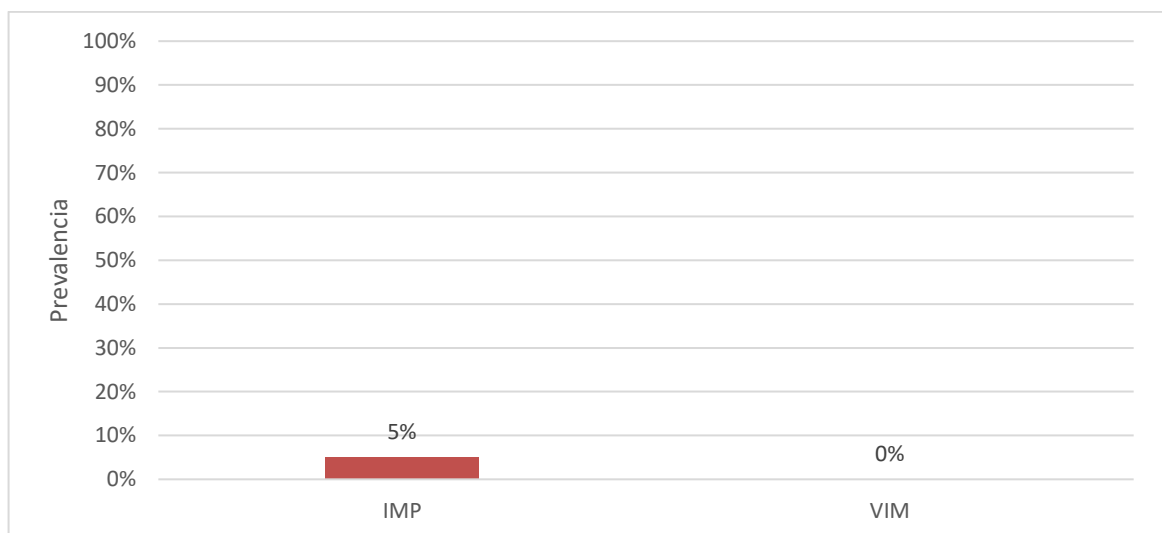


Figura 29. Prevalencia de genes bla_{IMP} y bla_{VIM} en cepas de *A. baumannii*.

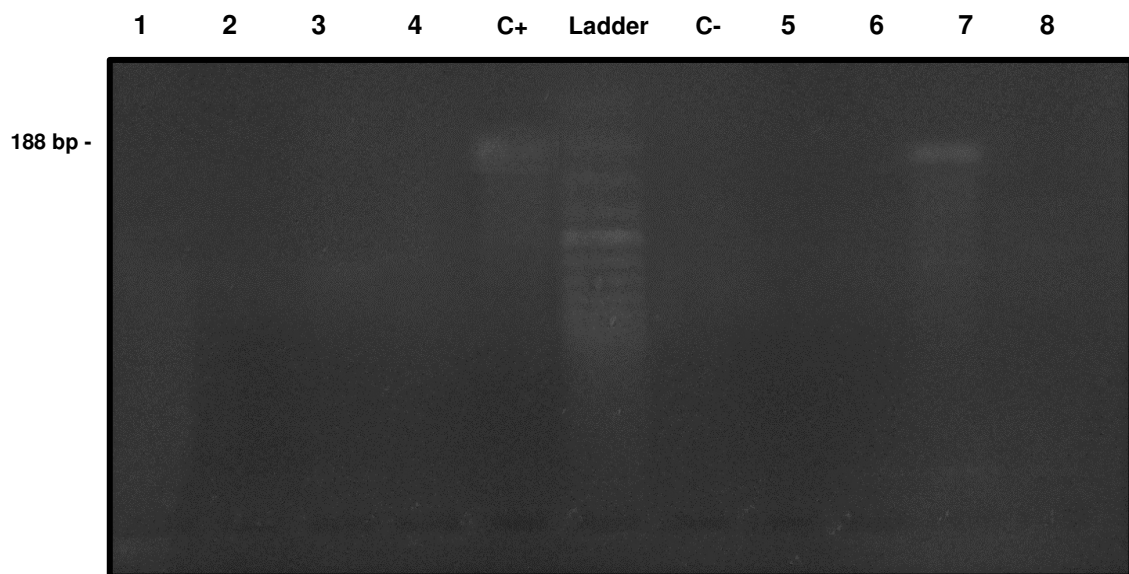


Figura 30. Electroforesis de PCR simple del gen bla_{IMP} en cepas de *A. baumannii*. C+: Control positivo C-: Control negativo. Muestra aba-1, aba-2, aba-3, aba-4, aba-5, aba-6 y aba-8: Negativo para gen bla_{IMP}. Muestra aba-7: Positivo para gen bla_{IMP}.

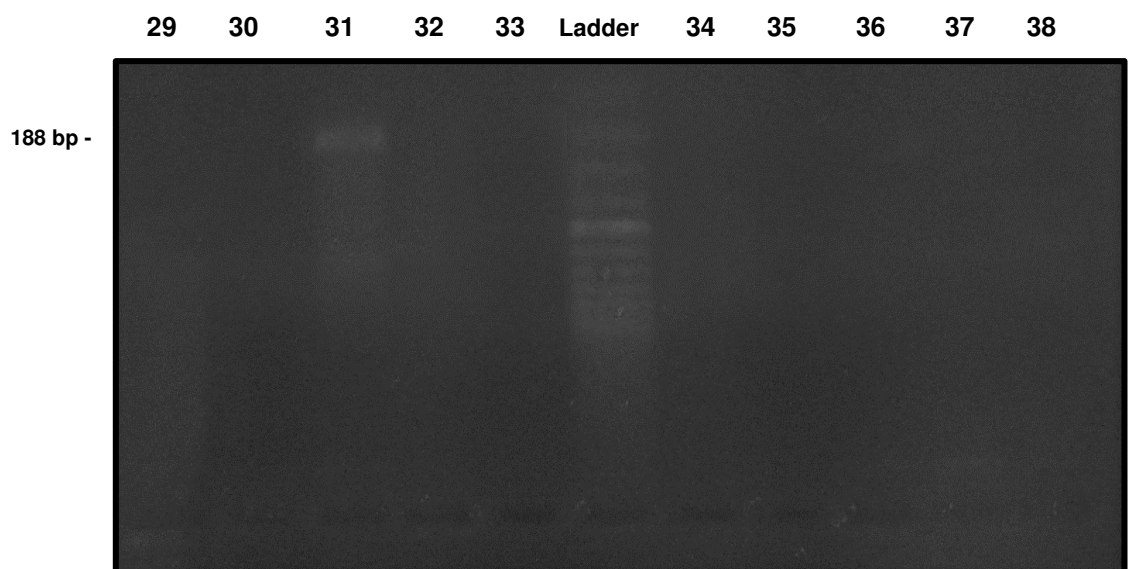


Figura 31. Electroforesis de PCR simple del gen bla_{IMP} en cepas de *A. baumannii*. Muestra aba-29, aba-30, aba-32, aba-33, aba-34, aba-35, aba-36, aba-37 y aba-38: Negativo para gen bla_{IMP}. Muestra 31: Positivo para gen bla_{IMP}.

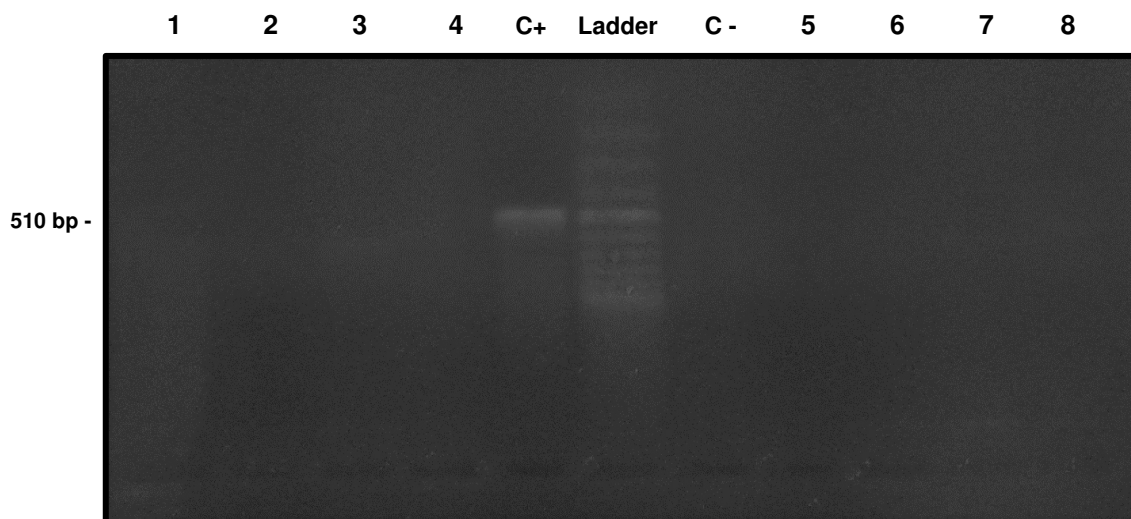


Figura 32. Electroforesis de PCR simple del gen *bla_{VIM}* en cepas de *A. baumannii*. C+: Control positivo. C-: Control negativo. Muestra aba-1, aba-2, aba-3, aba-4, aba-5, aba-6, aba-7 y aba-8: Negativo para gen *bla_{VIM}*.

Tabla 12. Presencia simultánea de genes *bla_{oxa-23-like}*, *bla_{oxa-24-like}*, *bla_{oxa-51-like}*, *bla_{oxa-58-like}*, *bla_{IMP}* y *bla_{VIM}* en cepas de *A. baumannii*.

Gen	Nº de aislamientos (n=40)	Prevalencia
<i>bla_{IMP}</i> y <i>bla_{oxa-51-like}</i>	1	2.5 %
<i>bla_{IMP}</i> y <i>bla_{oxa-51-like}</i> y <i>bla_{oxa-23-like}</i>	1	2.5 %

Fuente: Elaboración Propia

VII. DISCUSIÓN

La resistencia a los fármacos carbapenémicos está mediada principalmente por cuatro clases de enzimas, según la clasificación de Ambler. Las carbapenemasas mayormente reportadas en *Acinetobacter baumannii* pertenecen a la familia serina betalactamasas de clase D (OXAs) y a la familia metalobetalactamasas de clase B (IMP/VIM) ⁽⁶⁸⁾. Por ello, se determinó la prevalencia de genes OXAs, VIM e IMP en cepas *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos aisladas en el Hospital Nacional Hipólito Unanue en Lima.

La identificación de la especie *Acinetobacter baumannii* en las cepas recolectadas se realizó mediante métodos convencionales y moleculares. Los métodos convencionales permiten identificar el género *Acinetobacter*, pero presentan una capacidad limitada para diferenciar las distintas especies; por ello, se sugiere la identificación molecular basada en la detección de gen RecA y una región ITS ⁽⁴⁵⁾.

El gen RecA juega un rol indispensable en el mantenimiento y diversificación del material genético bacteriano. Debido a su papel fundamental, es un gen bien conservado y, por ende, confiable para la identificación de especies genómicas que pertenecen al género *Acinetobacter* ^(69,70). La secuencia espaciadora intergénica (ITS) permite la identificación de especies bacterianas, ya que presenta una alta similitud en la misma especie. Según Chang *et al.* este método proporciona una alternativa precisa y confiable para la identificación de cepas del grupo genómico *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*, que son difíciles de diferenciar por características fenotípicas ^(44,45). Con los métodos descritos, se identificó que 100 % de las cepas clínicas recolectadas fueron *Acinetobacter baumannii*.

En la actualidad, los ensayos fenotípicos para determinar carbapenemasas se basan en métodos que miden la resistencia por la inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de un antibiótico, métodos de hidrólisis enzimática de carbapenémicos e inmunoensayos de flujo lateral ⁽⁷¹⁾. En el 2017, El Instituto Malbran publicó un algoritmo para la vigilancia en cepas de *Acinetobacter spp.* con sospecha de producir metalobetalactamasas que sugiere pruebas fenotípicas para diferenciar los tipos de carbapenemasas. Según este algoritmo, la diferenciación

de enzimas metalobetalactamasas de las oxacilinasas se puede realizar mediante el Blue Carba Test, acompañado de métodos de sinergismo doble disco con EDTA ⁽⁷²⁾. Por tal razón, para la determinación fenotípica de carbapenemasas se emplearon tres métodos: Blue Carba Test, Inactivación de carbapenémicos modificado con EDTA (eCIM) y sinergismo de doble disco con EDTA. La correlación de los resultados de estos métodos permitió la identificación fenotípica de enzimas metalobetalactamasas y oxacilinasas (Ver Anexo 06).

La prueba de Blue Carba permite la identificación enzimática de carbapenemasas en el género *Acinetobacter*, mediante la acidificación que se genera al hidrolizar el anillo betalactámico y se evidencia con la variación de color del azul de bromotimol ⁽⁷³⁻⁷⁵⁾. Además, el tiempo de reacción enzimática requerido sugiere el tipo de carbapenemasa presente en el aislamiento (KPC y MBL < 60' y OXAs > 60') ^(75,76). El total de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* evidenció la presencia de enzimas carbapenemasas al ser Blue Carba positivo. De las cuales, solo 28 cepas presentan enzimas oxacilinasas (70 %) y 12 cepas presentan enzimas KPC y/o metalobetalactamasas (30 %). Sin embargo, esta prueba no excluye la posibilidad de que cepas con un tiempo de reacción < 60' presenten enzimas oxacilinasas.

El método de inactivación de carbapenémicos modificado con EDTA (eCIM) permite diferenciar las metalobetalactamasas de las carbapenemasas de tipo serina, como las oxacilinasas y KPC. Los resultados de este método serán verídicos, siempre y cuando el método de inactivación a carbapenémicos modificado (mCIM) sea positivo, ya que se debe contrastar la inactivación de carbapenemasas con la inhibición de la actividad de las metalobetalactamasas por la presencia de EDTA ^(58,65). Cabe resaltar que este método está validado para *enterobacterias* productoras de metalobetalactamasas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), donde se evidencia una especificidad y sensibilidad del 100%; y además, recientemente se han reportado estudios en *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*, y si bien se necesitan más datos para evaluar el rendimiento de la prueba eCIM en estas bacterias, resulta ser un método fenotípico atractivo, simple y económico para la diferenciación de metalobetalactamasas y serincarbapenemasas ⁽⁷⁷⁻⁸¹⁾.

De las 40 cepas de *Acinetobacter baumannii* positivas en mCIM, solo 3 evidenciaron la posible presencia de metalobetalactamasas (7,5 %). No obstante, al no ser un método validado para *Acinetobacter baumannii*; es necesario corroborar estos resultados con los obtenidos en la prueba de sinergismo de doble disco con EDTA, debido a que este último ha evidenciado un desempeño favorable en la detección de metalobetalactamasas en cepas de *Acinetobacter baumannii*.

Las metalobetalactamasas son inhibidas por agentes quelantes como el EDTA, los cuales se utilizan con frecuencia en métodos de detección basados en inhibidores. El método de sinergismo de doble disco con EDTA ha mostrado un buen desempeño para la detección de estas enzimas ⁽⁶⁾. Bedenic *et al.* ⁽⁸²⁾ reportó que los métodos basados en inhibidores presentan una sensibilidad del 100%, sin embargo, presentan una baja especificidad debido a que las enzimas oxacilinasas pueden disminuir su actividad ante la presencia de EDTA. En el total de aislamientos estudiados de *Acinetobacter baumannii*, sólo se evidencio la presencia de estas enzimas en 3 de ellos (7,5 %).

De la identificación fenotípica, se puede confirmar que 70 % de cepas de *Acinetobacter baumannii* presentó solo enzimas oxacilinasas y 7,5 % presentó enzimas metalobetalactamasas. Si bien la detección fenotípica mostró resultados fiables, fue relevante la detección genotípica para poder identificar los tipos de oxacilinasas y metalobetalactamasas presentes en las cepas estudiadas.

En la identificación genotípica se analizaron los genes bla_{oxa-23-like}, bla_{oxa-24-like}, bla_{oxa-51-like} y bla_{oxa-58-like}, asociados a las enzimas oxacilinasas; y, los genes bla_{IMP}, bla_{VIM}, asociados a las enzimas metalobetalactamasas. El presente estudio evidenció que el 100 % (40/40) de cepas portaban el gen bla_{oxa-51-like}; el cual, por ser un gen intrínseco, es considerado como un marcador de la especie *Acinetobacter baumannii*, como reportan Castillo y Nieto ^(83,84) en Perú en 2017, donde, a partir de aislamientos de *Acinetobacter spp* identificaron el 70,5 % (79/112) como *A. baumannii* mediante la detección del gen bla_{OXA-51-like}.

La prevalencia del gen bla_{oxa-24-like} fue 72,5 % (29/40), del gen bla_{oxa-23-like} 35 % (14/40) y del gen bla_{oxa-58-like} 0 % (0/40). Estos resultados son congruentes con los estudios reportados en Perú por Blitchtein *et al.* ⁽⁸⁵⁾ en 2018 y Casas y Castillo ⁽²⁰⁾ en 2019, donde se evidencia una mayor prevalencia del gen bla_{oxa-24-like} y menor prevalencia del gen bla_{oxa-23-like} y bla_{oxa-58-like} en aislamientos de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos. Blitchtein *et al.* halló la presencia del gen bla_{OXA-24-like} en 81,3 % (65/80), y el gen bla_{OXA-23-like} en 13,8 % (11/80) ⁽⁸⁵⁾; asimismo, Casas y Castillo reportaron presencia de genes bla_{OXA-24-like} en 74,5 % (38/51), bla_{OXA-58-like} en 9,8 % (5/51) y la ausencia del gen bla_{OXA-23-like} ⁽²⁰⁾. Por el contrario, Castillo y Nieto en Perú en 2017, detectaron prevalencia genética de 95,7 % (44/46) del gen bla_{OXA-23-like} y 2,2 % (1/46) del gen bla_{OXA-24-like}, al igual que nuestro estudio, no evidenciaron la presencia del gen bla_{OXA58-like} ^(83,84).

En comparación con las oxacilinasas, se ha reportado una menor frecuencia de resistencia a carbapenémicos en cepas de *A. baumannii* por metalobetalactamasas. En nuestro estudio, la presencia del gen bla_{IMP} fue detectado en 5,0 % (2/40) y no se evidenció la presencia del gen bla_{VIM}. A diferencia de los estudios de Lee *et al.* ⁽⁸⁶⁾ en Corea en 2003 y Goudarzi *et al.* ⁽⁸⁷⁾ en Irán en 2019, donde la prevalencia es mayor en el gen bla_{VIM}, respecto al gen bla_{IMP}. Lee *et al.* reportó la prevalencia del gen bla_{VIM-2} en 10,11 % (27/38) y del gen bla_{IMP-1} en 4,11 % (11/38) ⁽⁸⁶⁾. Posteriormente, Goudarzi *et al.*, informo la prevalencia de los genes bla_{VIM}, bla_{IMP}, bla_{NDM} en el 7,03 % (9/128), 3,9 % (5/128) y 0 %, respectivamente en aislados de *Acinetobacter baumannii* ⁽⁸⁷⁾.

Sin embargo, el estudio de Sader *et al.* ⁽⁸⁸⁾ en América Latina en 2005 demuestra una mayor prevalencia del gen bla_{IMP} (21 %) y no se evidencio la presencia del gen bla_{VIM} para *Acinetobacter baumannii*, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación. Al igual que Castillo y Nieto ⁽⁸³⁾ en Perú en 2017, no se reportó la presencia del gen bla_{VIM}; no obstante, tampoco se evidenció la presencia del gen bla_{IMP}. Cabe resaltar, que, si bien el gen bla_{NDM} se presenta con menor frecuencia, se ha reportado la presencia del gen en 1.6 % (2/124) en el estudio de Rocha *et al.* ⁽⁸⁹⁾ en Perú en 2019; por ello, es fundamental su identificación para obtener un perfil genético completo de las cepas estudiadas.

Como se ha mencionado en la presente investigación, la creciente aparición de cepas resistentes a *Acinetobacter baumannii* representan un riesgo para la salud pública. Sin embargo, a pesar de que los avances en la farmacoterapia se han limitado a la modificación de estructuras químicas de los antibióticos ya existentes y/o terapias de combinación de diferentes fármacos; existen nuevas alternativas en la práctica clínica, como los péptidos antibióticos eucarióticos (PAE), que han demostrado amplio espectro bactericida en estudios *in vitro* de cepas multirresistentes de *Acinetobacter baumannii* ^(90,91). Es por ello, que la información obtenida en el presente estudio permitirá conocer los mecanismos resistencia bacteriana asociados a *Acinetobacter baumannii*, y así, establecer un perfil genotípico predominante en el país, lo que contribuirá a mejorar el control de la farmacoterapia del paciente y a evaluar nuevas estrategias terapéuticas.

VIII. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de genes OXA fue 100% (40/40), de genes IMP 5% (2/40) y de genes VIM 0% (0/40), en cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos recolectadas en el hospital Nacional Hipólito Unanue, Lima – Perú durante el período agosto a diciembre del 2019.
2. Mediante el método enzimático Blue Carba se evidenció la presencia de enzimas carbapenemasas en la totalidad de las cepas estudiadas (100%).
3. Mediante el método de Inactivación de carbapenémicos modificado con EDTA (eCIM) y la prueba de sinergismo de doble disco con EDTA, se determinó la presencia de metalobetalactamasas en 7,5 % de las cepas.
4. La prevalencia de los genes bla_{oxa-51-like}, bla_{OXA-23-like}, y bla_{OXA-24-like} en las cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos fueron 100 % (40/40), 35 % (14/40) y 72,5 % (29/40), respectivamente. Ningún aislamiento evidenció el gen bla_{oxa-58-like}.
5. La prevalencia del gen bla_{IMP} en las cepas de *A. baumannii* resistentes a carbapenémicos fue 5 % (2/40). Ningún aislamiento evidenció el gen bla_{VIM}.

IX. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda continuar investigaciones en los diferentes hospitales del Perú referente a prevalencia de genes codificantes involucrados en la resistencia a fármacos carbapenémicos por *Acinetobacter baumannii*. Los datos obtenidos de estos estudios permitirán establecer un perfil genotípico predominante en el país.
2. Para obtener una mejor evaluación de los genes codificantes de metalobetalactamasas involucrados en la resistencia de fármacos carbapenémicos en cepas de *Acinetobacter baumannii*, es recomendable considerar la determinación del gen *bla_{NDM}* y *bla_{SIM}*. Si bien la prevalencia de estos genes es baja, es importante la valoración de un perfil genético completo para garantizar un mejor tratamiento en infecciones causadas por esta bacteria.
3. Se recomienda ampliar este estudio, mediante la determinación de elementos de inserción ISAbA asociados al aumento de expresión de los genes *bla_{oxa}*. En *Acinetobacter baumannii*, las enzimas oxacilinasas están involucradas con mayor frecuencia en la resistencia de carbapenémicos, por tal motivo resulta importante investigar la presencia de este elemento de inserción ISAbA asociada a genes *bla_{oxa}*.
4. Ante el elevado costo de los métodos de detección molecular, es importante y necesario implementar métodos de detección menos complejos y económicos aplicables a los laboratorios de los centros de salud, las metalobetalactamasas inhiben su actividad frente a agentes quelantes como el EDTA, por lo cual el empleo de métodos de detección basados en la inhibición podrían ser una opción costo-beneficio viable.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Plan nacional frente a la resistencia a los antibióticos 2019 - 2021. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Madrid: Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social, Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios; 2019.
2. Organización Panamericana de la Salud. Tratamiento de las enfermedades infecciosas 2020 - 2022. 8th ed. Washintong,D. C.: OPS; 2019.
3. Bonev B, Brown N. Bacterial resistance to antibiotics - From molecules to man. Nueva Jersey: Wiley-Blackwell; 2019.
4. Rodriguez R, Bustillo D, Caicedo D, Cadena D, Castellanos C. *Acinetobacter baumannii*: patógeno multirresistente emergente. Méd UIS. 2016; 29(2): 113 - 135. doi. 10.18273/revmed.v29n2-2016010
5. Antunes L, Visca P, Towner K. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. Pathog Dis. 2014; 71(3): 292 - 301. doi:10.1111 / 2049-632X.12125
6. Vanegas J, Roncancio G, Jiménez J. *Acinetobacter baumannii*: Importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. Rev CES Medicina. 2014; 28(2): 233 - 246. doi: 10.21615/ces med.v28i2.2857
7. Hart M, Espinoza F, Del Carmen M, Martínez M, Montes Z. Resistencia a antibióticos en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas de enero a marzo del 2010 en el Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras". Rev Cubana Med. 2010; 49(3): 218 - 227.
8. Diomedi A. Infecciones de *Acinetobacter baumannii* pan-resistente. Consideraciones epidemiológicas y de manejo antimicrobiano actualizado. Rev Chil Infect. 2005; 22(4): 298 - 320. doi:http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182005000600003
9. Youn J, Chul K, Woo J, Suk Y, Myung J, Seob K, *et al*. Dissemination of IMP - 1 and OXA type - Lactamase in Cabapenem - resistant *Acinetobacter baumannii*. Korean J Lab Med. 2008; 28(1): 16 - 23. doi: 10.3343 / kjlm.2008.28.1.16

10. Hernán C, Nastro M, Famiglietti A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. Rev Argent Microbiol. 2018; 50(3): 327 - 333. doi:10.1016 / j.ram.2017.10.006
11. Barletta R, Pérez L, Castro G, Pujol M, Barletta E, Dueñas Y. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: un reto para la terapéutica actual. MediSur. 2018; 16(2): 322 - 334.
12. Boral B, Unaldi Ö, Ergin A, Durmaz R, Eser ÖK; Acinetobacter Study Group. A prospective multicenter study on the evaluation of antimicrobial resistance and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in intensive care units with clinical and environmental features. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2019; 18 (1): 19. doi: 10.1186 / s12941-019-0319-8.
13. Poirel L, Nass T, Nordmann P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class B β -Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010, 54 (1); 24 – 38. doi: 10.1128/AAC.01512-08
14. Amin M, Navidifar T, Shooshtari F, Gordazi H. Association of the genes encoding Metallo- β -Lactamase with the presence of integrons among multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Infec Drug Resist. 2019, 12:1171 – 1180. doi: <https://doi.org/10.2147/IDR.S196575>.
15. Khaledi M, Shahini A, Validi M et al. Phenotypic and genotypic detection of Metallo- β -Lactamases in *A. baumannii* isolates obtained from clinical samples in Shahrekord, southwest Iran. BMC Res Notes. 2019, 12 (597): 1 – 6. doi: <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4636>.
16. Hernández A, García E, Yagüe G, Gómez J. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. Rev Esp Quimioter. 2010; 23(1): 12 - 19.
17. Salazar E, Nieves B. *Acinetobacter spp.*: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. Rev Soc Ven Microbiol. 2005; 25(2): 178 - 191.
18. Brisou J, Prevota A. Etudes de systématique bactérienne. X. Révision des especes réunies dans le genre *Achromobacter*. Annales de l'Institut Pasteur. 1954; 86(6): 722 - 728. doi:13197842

19. García M. Relación de la resistencia antimicrobiana con la presencia de plásmidos en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas de pacientes internados del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen - Lima 2012. [Tesis de Pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
20. Casas G, Castillo K. Prevalencia de genes blaOXA-23-like, blaOXA-24-like y blaOXA-58-like en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos d un Hospital Nacional de Referencia en Lima durante diciembre 2017 - marzo 2018. [Tesis de Pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019.
21. Vijayakumar S, Biswas I, Veeraraghavan B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter spp.*: an update. Future Sci OA. 2019; 5(6): FSO395. doi: 10.2144/fsoa-2018-0127.
22. Nemec A. Classification and nomenclature of *Acinetobacter spp.* [Internet]. 2020. [consultado 12 Mayo 2020]. Disponible en: <https://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf>.
23. Pérez M. Mortalidad y virulencia en el patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*. [Tesis de Doctorado]. Bellaterra: Universidad Autónoma de Barcelona; 2018.
24. Rada J. *Acinetobacter* un patógeno actual. Rev Bol Ped. 2016; 55(1): 29 - 48.
25. Ahmad I, Nadeem A, Nyunt S, Eric B. Analysis of colony phase variation switch in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Plos one. 2019; 14(1): e0210082. doi: 10.1371/journal.pone.0210082.
26. Asif M, Ahmad I, Ur S. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. Infect Drug Resist. 2018; 11: 1249 - 1260. doi:10.2147 / IDR.S166750
27. Talbot G, Bradley J, Edwards J, Gilbert D, Scheld M, Bartlett J. Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2006; 42(5): 657 - 668. doi: 10.1086/499819.

28. Rice L. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J Infect Dis.* 2008; 197(8): 1079 - 1081. doi:10.1086/533452
29. World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. [Internet]. Ginebra; 2017 [consultado 7 Mayo 2020]. Disponible en: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1.
30. Maragakis L, Perl T. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Options. *Clin Infect Dis.* 2008; 46(8): 1254 – 1263. doi:<https://doi.org/10.1086/529198>.
31. McConnell M, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev.* 2013; 37(2): 130 - 155. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x
32. Eze E, Chenia H, El Zowalaty M. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infect Drug Resist.* 2018; 11: 2277 - 2299. doi:10.2147/IDR.S169894. PMID: 30532562
33. Saipriya K, Swathi C, Ratnakar K, Sritharan V. Quorum - sensing system in *Acinetobacter baumannii*: a potencial target for new drug development. *J Appl Microbiol.* 2019; 128(1): 1364 - 5072. doi: 10.1111/jam.14330.
34. Álvarez L. Caracterización de nuevos factores de virulencia del patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*. [Tesis de Doctorado]. La Coruña. Universidad Da Coruña; 2018.
35. Younes S, Fábrega A, Roca I, Sánchez V, Vila J, Panchón J. Role of OmpA in the Multidrug Resistance Phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(3): 1806 - 188. doi: 10.1128/AAC.02101-13.
36. Russo T, Luke N, Beanan J, Olson R, Sauberman S, MacDonald U, *et al.* The K1 Capsular Polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* Strain 307-0294 is a

Major Virulence Factor. Infect Immun. 2010; 78(9): 3993 - 4000. doi:10.1128 / IAI.00366-10

37. Gómez L, Pérez L, Pujol Y, Piña C. Caracterización de pacientes con neumonía por *Acinetobacter baumannii* asociada a la ventilación mecánica en las Unidades de Cuidados Progresivos. MediSur. 2016; 14(4): 389 - 403.
38. Rodríguez J, Pascual Á, Gálvez J, Muniain M, Rios J, Martinez L, *et al.* Bacteriemias por *Acinetobacter baumannii*: características clínicas y pronósticas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2003; 21(5): 242 - 247. doi: 10.1016/s0213-005x(03)72930-9.
39. Guerrero D, Perez F, Conger N, Solomkin J, Adams M, Rather P, *et al.* *Acinetobacter baumannii* - Associated Skin and soft tissue Infections: Recognizing a Broadening Spectrum of Disease. Surg Infect. 2010; 11(1): 49 - 57. doi:10.1089 / sur.2009.022.
40. Venegas J, Higuera L, Vargas C, Cienfuegos A, Rodríguez É, Roncancio G, *et al.* *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos causante de osteomielitis e infecciones de la piel y los tejidos blandos en hospitales de Medellín, Colombia. Biomédica. 2015; 22(4): 522 - 530. doi: 10.7705/biomedica.v35i4.2572.
41. Collado O, Barreto H, Rodríguez H, Barreto G, Abreu O. Especies bacterianas asociadas a infecciones del tracto urinario. Rev. Arch Med Camagüey. 2017; 21(4): 479 - 486.
42. González C, Izquierdo A, Luque M, Sánchez A, Díaz M, Torres M. Infecciones urológicas por acinetobácteres. Estudio de casos y aplicación del protocolo de actuación en enfermería. ENFURO. 2002;(82): 28 - 32.
43. Bocanegra P. Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* obtenidos en un Hospital de Tercer Nivel en Nueva León. [Tesis de Maestría]. Monterrey: Universidad Autónoma de Nueva León; 2013.
44. Chen T, Siu I, Wu R, Shaio M, Huang L, Fung C, *et al.* Comparison of one-tube múltiple PCR, automated ribotyping and intergenic spacer (ITS)

- sequencing for rapid identification of *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect. 2007; 13(8): 801 - 806. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01744.x
45. Chang H, Fang Y, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Tao C, Chain T. Species-Level Identification of Isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* Complex by Sequence Analysis of the 16S-23S rRNA Gene Spacer Region. J Clin Microbiol. 2005; 43(4): 1632 - 1639. doi:10.1128 / JCM.43.4.1632-1639.2005
 46. González M. Mecanismos de Resistencia a carbapenemes en cepas de *Acinetobacter baumannii* causantes de infecciones intrahospitalarias. [Tesis de Maestría]. México: Instituto Politécnico Nacional; 2010.
 47. Rodríguez N. Identificación de carbapenemasas en aislamientos clínicos multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*. [Tesis de Maestría]. Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Pública de México; 2014.
 48. Rumbo C. Análisis Molecular de factores asociados al éxito del patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*: Resistencia, transferencia génica y virulencia. [Tesis de Doctorado]. Coruña: Universidad de Coruña; 2014.
 49. García T. Estudio de la Epidemiología Molecular y Resistencia Antibiótica de Aislamientos Clínicos de *Acinetobacter baumannii* del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. [Tesis de Doctorado]. Murcia: Universidad de Murcia; 2016.
 50. López D, Torres M, Prada F. Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. Rev Univ. Salud. 2016; 18(1): 190 - 202.
 51. Robledo I, Aquino E, Santé M, Santana J, Otero D, León C, *et al.* Detection of KPC in *Acinetobacter spp.* in Puerto Rico. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(3): 1354 - 1357. doi:10.1128/AAC.00899-09
 52. Villalón P. Clonalidad y Resistencia de *Acinetobacter baumannii* y *Acinetobacter spp.* en la infección nosocomial. [Tesis de Doctorado]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2015.

53. Opazo A, Domínguez M, Bello H, Amyes S, Gonzáles-Rocha G. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Infect Dev Ctries*. 2012; 6(4): 311 – 316. doi: 10.3855/jidc.2310.
54. Huertas M. Epidemiología clínica y microbiológica de la infección/colonización por *Acinetobacter baumannii* en la unidad de cuidados intensivos del Hospital General La Mancha Centro durante los años 2007 - 2009. [Tesis de Doctorado]. Albacete: Universidad Castillo de la Mancha; 2014.
55. Saranathan R, Kumari R, Kalaivani R, Suresh S, Rani A, Purty S, *et al*. Detection of ISAba1 in association with a novel allelic variant of the b-lactamase ADC-82 and class D b-lactamase genes mediating carbapenem resistance among the clinical isolates of MDR *A. baumannii*. *J Med Microbiol*. 2017; 66(2): 103 - 111. doi: 10.1099/jmm.0.000395.
56. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamasas: ¿la tranquilidad antes de la tormenta? *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18 (2): 306 – 325. doi: 10.1128 / CMR.18.2.306-325.2005.
57. Manzano M, Mejía Z, Vargas G. Frecuencia de aislamiento de *Acinetobacter baumannii* en pacientes ingresados en los servicios del Hospital Nacional Rosales en el período de enero a junio 2016. [Tesis de Pregrado]. El Salvador: Universidad de El Salvador; 2017 Junio.
58. Cappuccino J, Sherman N. *Microbiology: a laboratory manual*. 10th ed. Nueva York: Pearson; 2014.
59. Sacsquispe R, Ventura G. *Manual de Procedimientos Bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias*. Lima: Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud; 2001.
60. HiGenoMB®. HiPurA® Bacterial Genomic DNA Purification Kit. [Internet]. [consultado 10 octubre 2020]. Disponible en: <http://himedialabs.com/TD/MB505.pdf>.
61. Sacsquispe R, Velazquez J. *Manual de Procedimientos Para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión*. Lima: Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud; 2002.

62. CLSI M100-ED28: 2018 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
63. Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos, INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Servicio Antimicrobianos. BLUE CARBA - Detección rápida de Carbapenemasas directo de placa de cultivo. [Internet]. 2014 [consultado 25 Julio 2020]. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/BUE-CARBA-.pdf>.
64. Sfeir M, Hayden J, Fauntleroy K, Mazur C, Johnson J, Simner P, *et al.* EDTA-Modified Carbapenem Inactivation Method: a Phenotypic Method for Detecting Metallo--Lactamase Producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2019; 57(5): 1 - 9. doi: 10.1128/JCM.01757-18
65. Laboratorios Britania S.A. Monodiscos de EDTA. [Internet]. [consultado 14 Julio 2020]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/207_hoja_tecnica_es.pdf.
66. Handal R, Qunibi L, Sahouri I, Juhari M, Dawodi R, Marzouqa H, *et al.* Characterization of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Hospitalized Patients in Palestine. Int J Microbiol. 2017; 2017(8012104): 1 - 7. doi:10.1155/2017/8012104
67. Mostachio A, Heidjen I, Rossi F, Levin A, Costa S. Múltiple PCR for the rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo-beta-lactamases in *Acinetobacter spp* resistant to carbapenems. J Med Microbiol. 2009; 58(11): 1522 - 1524. doi:10.1099 / jmm.0.011080-0
68. Poiriel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2006; 12(9): 826 - 836. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x
69. Krawczyk B, Lewandowski K, Kur J. Comparative studies of the *Acinetobacter* genus and the species identification method based on the

recA sequences. Mol Cell Probes. 2002; 16(1): 1 - 11. doi:10.1006 / mcpr.2001.0388

70. Aranda J, Bardina C, Beceiro A, Rumbo S, Cabral M, Barbé J, *et al.* *Acinetobacter baumannii* RecA Protein in Repair of DNA Damage, Antimicrobial Resistance, General Stress Response, and Virulence. J Bacteriol. 2011; 193(15): 3740 - 3747. doi:10.1128 / JB.00389-11
71. Tamma P, Simner P. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. J Clin Microbiol. 2018; 56(11): 1 - 13. doi: 10.1128/JCM.01140-18.
72. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS "DR. CARLOS G. MALBRAM". Servicio Antimicrobianos. Algoritmo actualizado 2017 para la vigilancia de MBL KPC en *Acinetobacter spp.* [Internet]. 2017. [consultado 23 Julio 2020]. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/2018/05/algoritmo-actualizado-2017-para-la-vigilancia-de-mbl-kpc-en-acinetobacter-spp/>.
73. Muñoz C, Zumarán C, González T, Wozniak A, Castillo C, García P. Evaluación de test rápidos y diseño de una estrategia para la detección y caracterización de carbapenemasas en cepas de bacilos gramnegativos. Rev. Chilena Infectol. 2017; 34(4): 326 - 332. doi:10.4067 / s0716-10182017000400326
74. Pasteran F, Veliz O, Cerlana P, Lucero C, Rapoport M, Albornoz E, *et al.* Evaluation of the Blue-Carba Test for Rapid Detection of Carbapenemases in Gram-Negative Bacilli. J Clin Microbiol. 2015; 53(6): 1996 - 1998. doi:10.1128 / JCM.03026-14
75. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. J Clin Microbiol. 2013; 51(12): 4281 - 4283. doi:10.1128 / JCM.01634-13
76. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS "DR. CARLOS G. MALBRAN". Servicio Antimicrobianos. Blue Carba. [Internet]. 2014 [consultado 23 Julio 2020]. Disponible en:

<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/BUE-CARBA-.pdf>.

77. Jenkins S, Ledebor N, Westblade L, Burnham CA, Faron M, Bergman Y, *et al.* Evaluation of NG-Test CARBA 5 for Rapid Phenotypic Detection and Differentiation of Five Common Carbapenemase Families: Results of a Multicenter Clinical Evaluation. J Clin Microbiol. 2020; 58(7): 1 - 32. doi:10.1128/JCM.00344-20
78. Gill C, Lasko M, Asempa T, Nicolau D. Evaluation of the EDTA-Modified Carbapenem Inactivation Method for Detecting Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 2020; 58(6): 1 - 24. doi:10.1128 / JCM.02015-19
79. Beresford R, Maley M. Reduced Incubation Time of the Modified Carbapenem Inactivation Test and Performance of Carbapenem Inactivation in a Set of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae with a High Proportion of blaIMP Isolates. J Clin Microbiol. 2019; 57(7): 1 - 7. doi:10.1128 / JCM.01852-18
80. Li J, Li C, Cai X, Shi J, Feng L, Tang K, *et al.* Performance of modified carbapenem inactivation method and inhibitor-based combined disk test in the detection and distinguishing of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. Ann Transl Med. 2019; 7(20): 1 - 7. doi:10.21037 / atm.2019.09.43
81. Van der Zwaluw K, de Hann A, Pluister G, Bootsma H, de Neeling A, Schouls L. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. PLoS One. 2015; 10(3):e0123690. doi: 10.1371/journal.pone.0123690.
82. Bedenić B, Ladavac R, Vranić-Ladavac M, Barišić N, Karčić N, Sreter KB, Mihaljević S, Bielen L, Car H, Beader N. Falso positivo fenotípico detección de metallo-beta-lactamasas en *Acinetobacter baumannii*. Acta Clin croata. 2019; 58 (1): 113-118. doi: 10.20471 / acc.2019.58.01.15.

83. Castillo Y, Nieto C. Detección molecular de los genes que confieren resistencia a carbapenémicos en *Acinetobacter baumannii* aislados de hemocultivos procedentes de hospitales de Lima durante el período 2008-2013. [Tesis de Pregrado]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2017. doi:10.17843/rpmesp.2019.362.4152
84. Castillo Y, Nieto C, Astocondor L, Jacobs J, Garcia C. Bacteriemia por *Acinetobacter baumannii* productor de oxacilinasa en hospitales de lima, Perú. Rev. Peru Med Exp Salud Publica. 2019; 36(2): 364 - 366.
85. Blitchtein S, Roca I, Plasencia S, Vicente W, Velásquez J, Muñoz L, et al. Emergence and spread of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Perú. Emerg Microbes Infect. 2018; 7(1): 1 - 9. doi:10.1038 / s41426-018-0127-9
86. Lee K, Lee W, Uh Y, Yin G, Cho J, Chong Y. VIM- and IMP-Type Metallo- β -lactamase–Producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean Hospitals. Emerg Infect Dis. 2003; 9(7): 868 - 871. doi:10.3201/eid0907.020753
87. Goudarzi H, Mirsamadi ES, Ghalavand Z, Hakemi M, Mirjalali H, Hashemi A. Rapid detection and molecular survey of blaVIM, blaIMP and blaNDM genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* using new múltiple real-time PCR and melting curve analysis. BCM Microbiol. 2019; 19(1):122. doi: 10.1186/s12866-019-1510-y.
88. Sader H, Castanheira M, Mendes R, Toleman M, Walsh T, Jones R. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Int J Antimicrob Agents. 2005; 25: 57 - 61. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.08.013.
89. Rocha C, Bernal M, Canal E, Rios P, Meza R, Lopez M, et al. First Report of New Delhi Metallo- β -Lactamase Carbapenemase–Producing *Acinetobacter baumannii* in Peru. Am J Trop Med Hyg. 2019; 100(3): 529 - 531. doi:10.4269 / ajtmh.18-0802
90. Garnacho J, et al. Tratamiento antibiótico de las infecciones graves por *Acinetobacter* spp. ReMI. 2004; 4(6): 1 – 9.

91. Rivas L, Andreu D. Péptidos antibióticos eucarióticos:¿Una nueva alternativa en clínica?. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2003; 21(7): 358 - 65. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(03\)72963-2](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(03)72963-2)

XI. ANEXOS

ANEXO N° 01: APROBACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

	PERÚ	Ministerio de Salud	Hospital Nacional "Hipólito Unanue"	Comité Institucional de Ética en Investigación
---	------	------------------------	--	---

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

CARTA N° 034 - 2021 - CIEI - HNHU

A : Lic. Tecnólogo Médico ROKY GOVANNI CHAMPI MERINO

ASUNTO : Aprobación de Proyecto de Investigación

Referencia : Expediente N° 20-0036580-001

FECHA : El Agustino, 22 de abril del 2021

Es grato dirigirme a usted, para saludarle cordialmente y dar respuesta al documento de referencia donde solicita revisión y aprobación del Proyecto de Investigación: " **Caracterización molecular y sensibilidad antimicrobiana de bacterias Gram negativas no fermentadoras aisladas en Hospitalización y Unidad de Terapia Intensiva, Hospital Nacional Hipólito Unanue, 2019 - 2020**".

El Comité, en sesión virtual del miércoles 24 de marzo del presente año, y según consta en el Libro de actas N° 7, acordó por unanimidad: Aprobar el Proyecto de Investigación del estudio antes mencionado, que se realizará en las Instalaciones del Hospital.

La vigencia del periodo de renovación del Protocolo mencionado es por un año, el mismo que caducará el 24 de marzo del 2022. Notificar inmediatamente al CIEI de cualquier enmienda, desviación o incidente. El Investigador reportará cada seis (06) meses el avance del Protocolo de investigación y alcanzar al término de este estudio un informe final.

Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Atentamente,



Avenida César Vallejo N° 1390 distrito El Agustino - Lima - Perú
Correo electrónico : ciei@hnhu.gob.pe - angelicaricci05@yahoo.es Teléfono: 2919092 , 3627777 anexo 2196

ANEXO N° 02: MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Materiales

- ✓ Asas de siembra estériles descartables de 10 µL.
- ✓ Asas de siembra.
- ✓ CrioBox
- ✓ Crio viales estériles.
- ✓ Cubreobjetos y portaobjetos
- ✓ Microplacas de 96 pocillos
- ✓ Frascos de vidrio Pyrex 250 mL, 500 mL y 1 L.
- ✓ Hisopos estériles.
- ✓ Micropipetas de 0,5 µL – 10 µL, 10 µL – 100 µL y de 100 µL – 1000 µL.
- ✓ Pinzas metálicas estériles.
- ✓ Pipetas de vidrio Pyrex 10 mL y 20 mL.
- ✓ Placas petri estéril descartable 90x15 mm.
- ✓ Probetas de vidrio Pyrex 100 mL y 500 mL.
- ✓ Propipetas.
- ✓ Tips para micropipetas.
- ✓ Tubos de ensayo de vidrio Pyrex.
- ✓ Tubos eppendorf 2mL

Medios de Cultivo

- ✓ Agar citrato de Simmons (Merck).
- ✓ Agar MacConkey (Merk)
- ✓ Agar Mueller Hinton (Merck).
- ✓ Agar Sangre (Merk)
- ✓ Agar Triple Sugar Iron (Merck).
- ✓ Agar Trypticase Soya TSA (Merck).
- ✓ Caldo Trypticase Soya TSB (Merck).
- ✓ Medio de Motilidad – Indol – Ornitina M.I.O. (Merck)

Reactivos

- ✓ Aceite de inmersión.

- ✓ Agua destilada.
- ✓ Agua Oxigenada 10 volúmenes.
- ✓ Agua para inyección.
- ✓ Alcohol absoluto.
- ✓ Azul de bromotimol
- ✓ BactiDrop Oxidasa (Remel).
- ✓ Buffer TBE 0,5X.
- ✓ Primers para bla_{OXA}-23-like, bla_{OXA}-24-like, bla_{OXA}-51-like y bla_{OXA}-58-like (Invitrogen).
- ✓ Primers para IMP - VIM (Invitrogen).
- ✓ Primers para RecA - ITS (Invitrogen).
- ✓ Discos de EDTA/SMA 10 ug (Britania)
- ✓ Discos de Imipenem 10 ug (Bioanalyse)
- ✓ Discos de Meropenem 10 ug (Bioanalyse).
- ✓ DNA Loading dye 6X (Fermentas).
- ✓ Fluorescent dye reagent 6X (Geneon).
- ✓ Gel de Agarosa 2 %.
- ✓ HiPura®Bacterial Genomic DNA purification Kit
- ✓ Ladder 100 bp ADN (Axygen).
- ✓ Lisozima (50 mg/mL).
- ✓ Mix PCR
- ✓ Kit completo para tinción Gram
- ✓ Solución salina estéril.
- ✓ Tienam MSD (Imipenen, Cilastina 500mg/500mg)

Equipos

- ✓ Autoclave (ALP).
- ✓ Balanza analítica (Sartorius).
- ✓ Balanza analítica (Denver Instrument).
- ✓ Baño maria con agitación (Selecta Digiterm 100).
- ✓ Cabina de Bioseguridad Clase II (Telstar).
- ✓ Centrifuga (K model: PLC-012E).
- ✓ Congeladora (Bosh).
- ✓ Equipo de electroforesis (Compact XS/S Biometra).
- ✓ Fuente de poder (Biometra standard power pack p25).

- ✓ Incubadora (Incucell y XMDT series TEMP CONT).
- ✓ Microscopio (Optika).
- ✓ Nefelometro (GRANT USA INC.)
- ✓ PC con Microsoft Office
- ✓ Refrigeradora (Coldex).
- ✓ Termociclador (Eppendorf Mastercycler).
- ✓ Transiluminador (UV star 312 nm Biometra).
- ✓ Vortex (D LAB).

ANEXO N° 03: HIPURA – BACTERIAL GENOMIC DNA PURIFICATION KIT

MB505 HiPura® Bacterial Genomic DNA Purification Kit

Kit Contents

Product Code	Reagents provided	20 Preps	50 Preps	250 Preps
DS0014	Gram Positive Lysis Solution (GPLA)	6 ml	15 ml	75 ml
DS0015	Lysis Solution (AL)	5.6 ml	14 ml	70 ml
DS0010	Lysis Solution (CL)	6 ml	15 ml	75 ml
DS0031	Prewash Solution (PWR)	12 ml	30 ml	150 ml
DS0012	Wash Solution Concentrate (WS)	4 ml	10 ml	50 ml
DS0040	Elution Buffer (ET) (10 mM Tris-Cl, pH 8.5)	6 ml	15 ml	75 ml
MB086	Proteinase K	10 mg	25 mg	125 mg
DS0003	RNase A Solution (20 mg/ml)	0.5 ml	1.25 ml	6.25 ml
MB098	Lysozyme	0.28 gm	0.7 gm	3.5 gm
DBCA03	HiElute Miniprep Spin Column (Capped) (in DBCA16 Collection Tube)	20 nos	50 nos	250 nos
DBCA016	Collection Tube (Uncapped)	20 nos	50 nos	250 nos
PW1139	Collection Tube, Polypropylene (2.0 ml)	40 nos	100 nos	2 X 250 nos

Intended Use

Recommended for isolation of DNA from bacterial cultures

Introduction

HiPura® Genomic DNA Purification Kits provide a fast and easy method for purification of total DNA for reliable applications in PCR, Southern blotting technique etc. The DNA purification procedure using the miniprep spin columns comprises of three steps viz. adsorption of DNA to the membrane, removal of residual contaminants and elution of pure genomic DNA. Himedia's HiElute Miniprep Spin Column (Capped) format allows rapid processing of multiple samples. The columns have a high binding capacity and high quality DNA is obtained from various species. The DNA obtained is compatible with downstream applications such as restriction enzyme digestion, PCR amplification and Southern blotting.

HiPura® Bacterial Genomic DNA Purification Kit

This kit simplifies isolation of DNA from bacteria (Gram positive and Gram negative) by the spin-column procedure. Bacterial cells are grown in a medium till they reach log phase and are harvested by centrifugation. After harvesting, the bacterial (Gram positive) cell wall is degraded by Lysozyme and Proteinase K. For Gram negative bacteria, the lysozyme treatment is not required. Following lysis, the DNA is bound to the silica-gel membrane of the HiElute Miniprep Spin Column (Capped) to yield approximately upto 20 µg of pure DNA.

Two rapid wash steps remove trace amount of salt and protein contaminants resulting in the elution of pure DNA in the Elution Buffer provided with the kit.

HiElute Miniprep Spin Column (Capped) [DBCA03]

HiElute Miniprep Spin Column (Capped) is based on the advanced silica binding principle presented in a microspin format. The system efficiently couples the reversible nucleic acid-binding properties of the advanced silica gel membrane and the speed plus versatility of spin column technology to yield high quantity of DNA. The use of spin column facilitates the binding, washing, and elution steps thus enabling multiple samples to be processed simultaneously. This column eliminates the need for alcohol precipitation, expensive resins, and harmful organic compounds such as phenol and chloroform, otherwise employed in traditional DNA isolation techniques. DNA binds specifically to the advanced silica-gel membrane while contaminants pass through. PCR inhibitors such as divalent cations and proteins are completely removed in two efficient wash steps, leaving pure nucleic acid to be eluted in the buffer provided with the kit. The purified DNA is upto 20-30 kb in length and can be used for further downstream applications.

Elution

The yield of genomic DNA depends on the sample type and the number of cells in the sample. A single elution with 200 µl of Elution Buffer (ET) will provide sufficient DNA to carry out multiple amplification reaction. Elution with volume less than 200 µl will increase the final DNA concentration, but will reduce the overall DNA yield. The eluted DNA ranges in size upto 20-30 kb, and is suitable for direct use in PCR, restriction digestion, and Southern blotting applications.

Concentration, yield and purity of DNA

Spectrophotometric analysis and agarose gel electrophoresis will reveal the concentration and the purity of the genomic DNA. Use Elution Buffer (ET) to dilute samples and to calibrate the spectrophotometer, measure the absorbance at 260 nm, 280 nm and 320 nm using a quartz microcuvette. Absorbance readings at 260 nm should fall between 0.1 and 1.0. The 320 nm absorbance is used to correct for background absorbance. An absorbance of 1.0 at 260 nm corresponds to approximately 50 µg/ml of DNA. The A_{260}/A_{280} ratio should be 1.6-1.9. Purity is determined by calculating the ratio of absorbance at 260 nm to absorbance at 280 nm. DNA purified by HiPura® Bacterial Genomic DNA Purification Kit is free of protein and other contaminants that can inhibit PCR or other enzymatic reactions.

Concentration of DNA sample (µg/ml) = $50 \times A_{260} \times$ dilution factor.

Materials needed but not provided

- 37°C water bath or heating block
- 55°C water bath or heating block
- Tabletop Microcentrifuge (with rotor for 2 ml tubes)
- Ethanol (96 - 100%)
- Lysoestaphin (Optional) (For *Staphylococcus* species only)
- Mutanolysin (Optional) (For *Streptococcus* species only)
- Molecular Biology Grade Water (Product code: ML064)

Storage

Store the HiPura® Bacterial Genomic DNA Purification Kit between 15-25°C except certain components as specified on each label. Under recommended condition kit is stable for 1 year.

General Preparation Instructions

1. Preheat a water bath or heating block to 55°C.
2. Preheat a water bath or heating block to 37°C (for Gram positive bacteria only).
3. **Thoroughly mix reagents**
Examine the reagents for precipitation. If any kit reagent forms a precipitate (other than enzymes), warm at 55-65°C until the precipitate dissolves and allow cooling to room temperature (15-25°C) before use.
4. Ensure that clean & dry tubes and tips are used for the procedure.
5. **Dilute Wash Solution Concentrate (WS) (DS0012) as follows:**

Number of Preps	Wash Solution Concentrate (WS)	Ethanol (96-100%)
20	4 ml	16 ml
50	10 ml	40 ml
250	50 ml	200 ml

6. Reconstitute Proteinase K (MB086)

The HiPurA® Bacterial Genomic DNA Purification Kit contains Proteinase K. Intensive research has shown that it is the optimal enzyme for use with the Lysis Solution provided in the kit. It is completely free of DNase and RNase activity. Proteinase K is the enzyme of choice for use with an SDS containing Lysis Solution. The specific activity of Proteinase K is 33.5 units/mg dry weight.

Resuspend the Proteinase K (MB086) powder in Molecular Biology Grade Water (ML064) to obtain a 20 mg/ml stock solution.

Number of Preps	Proteinase K	Molecular Biology Grade Water
20	10 mg	0.5 ml
50	24 mg	1.25 ml
250	125 mg	6.25 ml

The product as supplied is stable at room temperature (15-25°C); upon reconstitution store at -20°C as mentioned in storage instructions.

NOTE: The Proteinase K solution must be added directly to each sample preparation every time. Do not combine the Proteinase K and Lysis Solution for storage.

7. Prepare Lysozyme Solution (Product Code: MB098) [For Gram positive bacteria only]

Prepare a 45 mg/ml solution of Lysozyme (approximately 2.115×10^6 unit/ml) with the Gram Positive Lysis Solution (GPLA) as the diluent, which is provided in the kit. Lysozyme solution should be freshly prepared prior to use.

Example: In order to make 1 ml of Lysozyme solution, dissolve 45 mg of lysozyme (provided) in 1 ml of Gram Positive Lysis Solution (GPLA). Pipette the mixture up and down or vortex to dissolve the lysozyme.

NOTE: Lysozyme dissolves readily by pipetting up and down as opposed to vortexing. Excessive vortexing may cause foaming.

For each DNA preparation, 200 µl of lysozyme solution is required. Make extra solution to account for pipetting error. The lysozyme solution should be preferably used on the day of preparation. If some Lysozyme stock solution is left, it can be stored at -20°C.

RNase A enzyme treatment

RNase A is a type of RNase that is commonly used in research. RNase A (e.g., bovine pancreatic ribonuclease A) is one of the sturdiest enzymes in common laboratory usage. It cleaves 3' end of unpaired C and U residues.

Unit Definition for RNase A

One unit of the enzyme causes an increase in absorbance of 1.0 at 260nm when yeast RNA is hydrolyzed at 37°C and pH 5.0. Fifty units are approximately equivalent to 1 Kunitz unit. It is completely free of DNases and proteases. The specific activity is 90 U/mg.

The product as supplied is stable at room temperature (15-25°C).

Centrifugation

All centrifugation steps are carried out in conventional laboratory centrifuge e.g. Beckman CS-6KR, Heraeus Varifuge 3.0R, or Sigma 6k10 with fixed angle rotor. The tubes provided with the kit are compatible with almost all laboratory centrifuges and rotors. All centrifugation steps are performed at room temperature (15-25°C) and are given in g; the correct rpm can be calculated using the formula:

$$RPM = \sqrt{RCF} / 1.118 \times 10^{-5} r$$

where RCF = required gravitational acceleration (relative centrifugal force in units of g); r = radius of the rotor in cm; and RPM = the number of revolutions per minute required to achieve the necessary g force.

Specimen Collection and Handling

Collect overnight culture from sterile flask with the help of micropipette. Store the remaining culture at 2-8°C for short term use.

Types of Specimen: Bacterial culture

Procedure

A. Gram Negative Bacterial Preparation

1. **Harvesting of cells**
Pellet 1.5 ml of an overnight bacterial broth culture in provided 2 ml capped collection tube by centrifuging for 2 minutes at 13,000rpm at room temperature (15-25°C). Remove the culture medium and discard.

NOTE: If bacteria are grown in rich media such as Terrific broth, it is necessary to reduce the volume of the starting material of the overnight broth culture to 0.5 ml in order to avoid overloading of the HiElute Miniprep Spin Column.

2. Resuspend cells

Resuspend the pellet thoroughly in 180 µl of Lysis Solution (AL) (DS0015).

3. Prepare for cell lysis

Add 20 µl of the Proteinase K solution (20 mg/ml) to the sample. Mix and incubate for 30 minutes at 55°C. If residual RNA is not a concern, continue with step 4.

Optional RNase A treatment

If RNA-free genomic DNA is required, add 20 µl of RNase A Solution (DS0003), mix and incubate for 5 minutes at room temperature (15-25°C), then continue with step 4.

4. **Lysate cells**
Add 200 µl of Lysis Solution (C1) (DS0010), vortex thoroughly (about 15 seconds) and incubate at 55°C for 10 minutes. Continue with step C (Prepare for binding).
NOTE: A homogeneous mixture is essential for efficient lysis.
 5. **Gram Positive Bacterial Preparation**
1. Prepare Lysozyme Solution using Lysozyme from chicken egg white, which is provided in the kit. Prepare a 45 mg/ml stock solution of Lysozyme as described under General Preparation Instructions. 200 µl of Lysozyme Solution is required per isolation procedure. Prepare extra solution to account for pipetting error.
NOTE: (Optional) For higher yields - If working with *Staphylococcus* species, supplement the Lysozyme Solution with 200 units/ml of Lyostaphin. For *Streptococcus* species, supplement the Lysozyme Solution with 250 units/ml of mutanolysin.
 6. **Harvest Cells**
Pellet 1.5 ml of bacterial broth culture in provided 2 ml capped collection tube by centrifuging for 2 minutes at 13,000 rpm at room temperature (15–25°C). Remove the culture medium completely and discard.
NOTE: If bacteria are grown in rich media such as Terrific broth, it is necessary to reduce the volume of the starting material of the overnight broth culture to 0.5 ml in order to avoid overloading of the HiElute Miniprep Spin Column.
 7. **Resuspend cells**
Resuspend the pellet thoroughly in 200 µl of lysozyme solution (prepared in step 1 of Gram Positive Bacterial Preparation) and incubate for 30 minutes at 37°C.
 8. **Lysate cells**
Add 20 µl of the Proteinase K solution (20 mg/ml) to the sample. If residual RNA is not a concern continue with step 5.
Optional RNase A treatment
If RNA free genomic DNA is required, add 20 µl of RNase A Solution (DS0003), mix and incubate for 5 minutes at room temperature (15–25°C), then continue with step 5.
 9. Add 200 µl of Lysis Solution (C1) (DS0010). Vortex thoroughly for few seconds and incubate at 55°C for 10 minutes, then continue with step C (Prepare for binding).
NOTE: A homogeneous mixture is essential for efficient lysis.
- DNA ISOLATION FROM GRAM POSITIVE AND GRAM NEGATIVE BACTERIA**
This is a continuation of the procedure from the lysates prepared in procedure A and B.
- C. **Prepare for binding**
Add 200 µl of ethanol (95–100%) to the lysate and mix thoroughly by vortexing for few seconds.
NOTE: A homogeneous mixture is essential. A white precipitate may form on addition of ethanol. It is essential to apply all of the precipitate to the HiElute Miniprep Spin Column. This precipitate does not interfere with the DNA isolation procedure or with any subsequent application. Do not use alcohols other than ethanol because this may result in reduced yields.

- D. **Load lysate onto HiElute Miniprep Spin Column (Capped) [DBCA03]**
Transfer the lysate obtained from step C onto HiElute Miniprep Spin Column (Capped) provided. Centrifuge at $\geq 6,500 \times g$ ($\approx 10,000$ rpm) for 1 minute at room temperature (15–25°C). Discard the flow-through liquid and place the spin column in same 2 ml collection tube.
NOTE: Use a wide bore pipette tip to reduce shearing of the DNA while transferring contents onto the column. It is essential to apply all of the precipitate to the column. If the solution has not completely passed through the membrane, spin at a higher speed until all the solution has passed through. Centrifugation at full speed will not affect the yield or purity of the DNA.
 - E. **Prewash**
Add 500 µl of Prewash Solution to the column and centrifuge at $\geq 6,500 \times g$ ($\approx 10,000$ rpm) for 1 minute at room temperature (15–25°C). Discard the flow-through liquid and re-use the same collection tube with the column.
 - F. **Wash**
(Prepare diluted Wash Solution (DS0012) as indicated in General Preparation Instructions)
Add 500 µl of diluted Wash Solution (WS) (DS0012) to the column and centrifuge for 3 minutes at 13,000 rpm at room temperature (15–25°C). Discard the flow through and spin again at same speed for the additional 1 minute to dry the column. The column must be free of ethanol before eluting the DNA.
 - G. **DNA Elution**
Transfer the HiElute Miniprep Spin Column (Capped) to fresh uncapped collection tube. Pipette 200 µl of the Elution Buffer (ET) (DS0040) directly into the column without spilling to the sides. Incubate for 1 minute at room temperature (15–25°C). Centrifuge at $\geq 6,500 \times g$ ($\approx 10,000$ rpm) for 1 minute at room temperature (15–25°C) to elute the DNA.
NOTE: To increase the elution efficiency, incubate for 5 minutes at room temperature (15–25°C) after adding the Elution Buffer (ET), then centrifuge. Elution with volumes less than 200 µl increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but slightly reduces the overall DNA yield. Storing DNA in water can cause acid hydrolysis.
 - H. Transfer the eluate to a fresh capped 2 ml collection tube for longer storage.
Storage of the eluate with purified DNA: The eluate contains pure genomic DNA. For short-term storage (24–48 hrs) of the DNA, 2–8°C is recommended. For long-term storage, -20°C or lower temperature (-80°C) is recommended. Avoid repeated freezing and thawing of the sample which may cause denaturing of DNA. The Elution Buffer will help to stabilize the DNA at these temperatures.
- Warning and Precautions**
Not for Medicinal Use. Read the procedure carefully before beginning the protocol. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. Follow good laboratory practices while handling samples. Standard precautions should be followed as per established guidelines. Safety guidelines may be referred in safety data sheets of the product.
- Limitations**
1. The yield of DNA depends upon the type and the volume of starting material used.

Performance and Evaluation

Each lot of HiMedia's HiPura® Bacterial Genomic DNA Purification Kit is tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

Quality Control

Type of Sample	DNA Yield	DNA Purity
Bacterial cells (1.5 ml)	Upto 20 µg	1.6-1.9

References

1. Sambrook, J., et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 1989).
2. Birren, B. and Lai, E. Pulsed Field Gel Electrophoresis: A practical guide (Academic Press, San Diego, CA, 1993).

Troubleshooting Guide:

Sr. No.	Problem	Possible Cause	Solution
1.	Lysozyme is difficult to dissolve	Solution is inadequately mixed	Pipette repeatedly to dissolve the lysozyme as opposed to vortexing; as vortexing will cause foaming, and reduce lysozyme solubility. Lysozyme may not dissolve readily; complete dissolution is not needed prior to use as it will dissolve during the 37°C incubation.
2.	HiElute Miniprep Spin Capped Column is clogged	Sample volume is large	Use smaller quantity of sample; to salvage the current preparation, clogging can be alleviated by increasing the g force or spinning for longer time until the lysate passes through the spin column.
3.	Lysate appears to be gelatinous prior to loading onto the column	Sample volume is large	Use fewer cells ($\leq 1 \times 10^{10}$ cells/ml). The incubation time and or the amount of Proteinase K solution or Lysozyme solution can be increased, depending on which procedure is performed i.e. for Gram positive or Gram negative bacteria. Eg: The incubation time and the amount of enzyme can be doubled.
4.	Poor / Lower yield of genomic DNA	Sample is old	Yield of genomic DNA varies from different species and strains of bacteria.

			It is necessary to use cells before they reach their maximum density or they become confluent.
	Incomplete lysis of cells		The incubation time and or the amount of Proteinase K solution or Lysozyme Solution can be increased, depending on which procedure is performed i.e. for Gram positive or Gram negative bacteria. eg: The incubation time and the amount of enzyme can be doubled.
	Lysate/Ethanol mixture is not homogenous		Vortex the tubes for atleast 5-10 seconds in order to obtain a homogenous solution before applying it to the column.
	DNA elution is incomplete. Eluate contains residual ethanol from the wash		DNA yield can be improved by incubating the Elution Buffer for 5 minutes at room temperature (15-25°C) after it is added to the column. Ethanol from the final wash should be eliminated completely before eluting DNA. Spin the tubes for longer time to dry the column completely.
	Wash Solution Concentrate was not diluted before use		Check that the Wash Solution Concentrate is properly diluted with ethanol as per instructions.
	Use of water instead of Elution Buffer for elution of DNA.		Elution Buffer is recommended for optimal yields and storage of the genomic DNA. If water is used instead of the Elution Buffer the pH should be at least 7.0 to avoid acidic conditions, which may cause acid hydrolysis of DNA when stored for long periods of time. (NOTE: Only DNase/RNase and Protease free water should be used for eluting DNA)

5.	Purity of the DNA is lower than expected; A_{260}/A_{280} ratio is low	Background reading is high due to silica fines	The DNA sample can be centrifuged at maximum speed for 1 minute, the supernatant can be used to repeat the absorbance readings.
		Sample diluted in water	Use either Elution Buffer provided, or (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA pH 9.0) or 10 mM Tris-HCl pH 8.0-8.5 as the eluant.
6.	Purity of the DNA is lower than expected; A_{260}/A_{280} ratio is too high.	RNA contamination	RNase A treatment should be included in future isolations or the final product can be treated with RNase A and repurified.
7.	DNA is sheared	Improper handling of genomic DNA	All pipetting steps should be executed as gently as possible. Wide orifice pipette tips are recommended to eliminate shearing of the DNA to a large extent. If the isolated DNA is to be used for PCR, mix with gentle pipetting or invert until homogenous, instead of vortexing as it reduces shearing of DNA considerably.
		Cells are old	Cells grown for a longer time period may lyse prematurely when subjected to cell wall lysing enzymes, which may result in the release of endogenous nucleases and subsequent DNA degradation.
8.	Downstream applications are inhibited	Traces of ethanol present in the final genomic DNA preparation	After the washing steps, the eluate should not come in contact with the column. Spin the column for 1 minute at maximum speed (12,000-16,000 x g) if necessary, after emptying the collection tube.
		Salt is carried over in the final genomic DNA preparation	The HiElute Miniprep Spin Capped Column should be transferred to a new 2.0 ml collection tube before adding the wash solution.

Please refer [Glossary](#) Overleaf.

Safety Information

HiPura® Bacterial Genomic DNA Purification Kit is for laboratory use only; not for drug, household or other uses. Take appropriate laboratory safety measures and wear gloves when handling. Avoid contact with skin, and use eye protection. In case of contact, wash with large amount of water. Seek medical attention. Not compatible with disinfecting agents containing bleach. Please refer the Safety Data Sheet (SDS) for information regarding hazards and safe handling practices.

Disposal

User must ensure safe disposal by autoclaving and/or incineration of used or unusable preparations of this product. Follow established laboratory procedures in disposing of infectious materials and material that comes into contact with clinical sample must be decontaminated and disposed off in accordance with current laboratory techniques.

Technical assistance

At HiMedia, we pride ourselves on the quality and availability of our technical support. For any kind of technical assistance, mail to mb@himediailabs.com.

PRDSDS_012109

Version 1.0



Storage temperature



Do not use if package is damaged



HiMedia Laboratories Pvt. Limited,
25 Vardaan Industrial Estate,
LBS Marg, Mumbai 400056, India

Disclaimer

User must exercise suitability of the product(s) in their application prior to use. Products contain solely for the information contained in this document. The information contained in this publication is based on our research and development work and other related information. It is not intended to be used for any other purpose. The information is provided for informational purposes only and is not intended to be used for any other purpose. The information is provided for informational purposes only and is not intended to be used for any other purpose. The information is provided for informational purposes only and is not intended to be used for any other purpose.

HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Reg. Office: 25, Vardaan Ind. Est., LBS Marg, Mumbai 400056, India. Customer care No: 022-41161617 Corporate office: 25, Vardaan Industrial Estate, LBS Marg, Mumbai-400056, India. Customer care No: 102-6417-1616 Email: mb@himediailabs.com Website: www.himediailabs.com

ANEXO N° 04: PERFIL ANTIMICROBIANO

Cepa	AMK	ATM	CAZ	CIP	GEN	FEP	IPM	MEM	SXT	DOX	LVX	TOB	SAM	CSL	TZP	COL	CCV	MNO	TGC														
Aba-1	6	R	13	R	12	R	6	R	14	R	6	R	0	R	14	6	R	13	6	12	R	0											
Aba-2	8	R	8	R	6	R	11	R	11	R	10	R	6	R	23	S	10	6	R	14	I	9	0	R	S	6	0	R	0				
Aba-3	9	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	13	I	15	0	R	14	0	0	R	0	0	R	0				
Aba-4	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	13	I	18	0	R	S	0	0	R	0	0				
Aba-5	6	R	15	R	13	R	6	R	6	R	9	R	6	R	0	R	12	6	R	12	I	15	0	R	13	0	6	R	0	0			
Aba-6	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	12	R	6	R	0	R	13	I	14	0	R	13	6	10	R	0	0	R	0	0			
Aba-7	13	R	15	R	6	R	6	R	10	R	12	R	11	R	6	R	25	S	14	10	R	24	S	24	0	R	13	6	24	S	0		
Aba-8	11	R	6	R	6	R	13	I	6	R	6	R	6	R	0	R	13	6	R	13	I	14	0	R	12	6	22	S	0	0			
Aba-9	6	R	10	R	6	R	6	R	13	R	6	R	6	R	6	R	12	I	0	11	R	13	6	0	R	0	0	R	0	0			
Aba-10	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	14	I	0	12	R	13	6	0	R	0	0	R	0	0			
Aba-11	6	R	10	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	12	I	13	0	R	15	9	0	R	0	0	R	0	0			
Aba-12	23	S	6	R	6	R	8	R	20	S	14	R	13	R	6	R	0	R	0	R	17	16	S	6	R	18	0	0	R	0	0		
Aba-13	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	0	R	11	6	R	13	I	13	0	R	14	0	0	R	13	0	0		
Aba-14	15	I	12	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	0	R	6	14	I	18	S	17	0	R	S	0	0	R	0	0	0		
Aba-15	8	R	6	R	6	R	10	R	10	R	9	R	8	R	6	R	0	R	12	6	R	16	S	17	0	R	15	0	0	R	0	0	
Aba-16	10	R	6	R	6	R	12	R	12	R	6	R	6	R	6	R	22	S	12	6	R	14	I	14	0	R	12	0	23	S	0	0	
Aba-17	14	R	10	R	6	R	6	R	6	R	8	R	8	R	0	R	12	8	R	0	R	13	8	R	12	0	0	R	0	0	0	0	
Aba-18	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	0	R	0	R	10	6	R	6	R	0	R	S	0	0	R	0	0	0	
Aba-19	14	R	11	R	6	R	6	R	6	R	13	R	6	R	6	R	0	R	11	11	R	12	I	14	0	R	S	0	0	R	0	0	
Aba-20	0	R	6	R	6	R	6	R	6	R	10	R	6	R	6	R	0	R	13	6	R	16	S	15	0	R	13	0	0	R	18	0	
Aba-21	15	I	14	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	23	S	13	13	I	14	I	15	0	R	13	0	0	R	0	0	
Aba-22	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	0	R	0	R	14	6	R	6	R	6	0	R	S	0	0	0	
Aba-23	10	R	10	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	14	6	R	12	I	16	0	R	13	0	9	R	0	0	
Aba-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	6	R	0	R	12	6	R	15	S	20	0	R	15	0	0	R	0	0	0	0	
Aba-25	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	0	R	14	6	R	12	I	13	0	R	13	0	10	R	0	0	
Aba-26	10	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	0	R	13	6	R	12	I	12	0	R	12	0	20	S	0	0	
Aba-27	12	R	6	R	6	R	12	R	11	R	8	R	8	R	24	S	12	6	R	0	R	17	0	R	S	0	22	S	0	0	0	0	
Aba-28	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	10	R	8	R	6	R	6	R	0	R	18	0	R	18	0	R	15	0	8	R	0	0	
Aba-29	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	6	R	6	R	0	R	11	6	R	14	I	14	0	R	14	0	0	R	0	0	
Aba-30	0	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	0	R	13	6	R	13	I	13	0	R	13	0	10	R	0	0	
Aba-31	0	R	6	R	6	R	6	R	6	R	10	R	6	R	6	R	0	R	12	6	R	12	I	6	0	R	12	0	18	S	0	0	
Aba-32	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	0	R	0	R	0	R	0	R	13	0	0	R	0	0	
Aba-33	0	R	10	R	6	R	6	R	6	R	14	R	10	R	6	R	6	R	6	R	10	R	12	0	R	S	0	0	R	0	0	0	0
Aba-34	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	6	R	0	R	10	6	R	13	I	15	0	R	15	0	R	15	0	8	R	0	0
Aba-35	0	R	11	R	6	R	6	R	6	R	10	R	8	R	0	R	11	9	R	14	I	14	0	R	S	0	14	I	0	0	0	0	
Aba-36	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	11	R	6	R	6	R	0	R	0	R	0	R	0	R	13	6	0	R	0	0	
Aba-37	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	6	R	6	R	6	R	6	R	13	I	14	0	R	13	6	0	R	0	0	0	0
Aba-38	0	R	11	R	6	R	6	R	6	R	12	R	6	R	6	R	0	R	10	6	R	13	I	14	0	R	12	0	13	I	0	0	0
Aba-39	8	R	8	R	6	R	11	R	11	R	10	R	6	R	11	R	6	R	14	I	9	0	R	S	6	0	R	S	6	0	R	0	0
Aba-40	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	6	R	6	R	12	6	R	12	I	15	0	R	S	0	8	R	0	0	0	0	0

AMK: Amikacina; ATM: Aztreonam; CAZ : Ceftazidima; CIP: Ciprrofloxacino; GEN: Gentamicina; FEP: Cefepime; IPM: imipenem; MEM: Meropenem; SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprima; DOX: Doxiciclina; LVX: Levofloxacino; TOB: Tobramicina; SAM: Ampicilina-Sulbactam; CSL: Ceftazidima-Sulbactam; TZP: Piperacilina-Tazobactam; COL: Colistina; CCV: Ceftazidima- clavulânico; MNO: Minociclina; TGC: Tigeciclina

AMK: Amikacina; ATM: Aztreonam; CAZ: Ceftazidima; CIP: Ciprofloxacino; GEN: Gentamicina; FEP: Ceftiofima; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; SXT: Sulfametoxazol-Trimetoprima; DOX: Doxiciclina; LVX: Levofloxacino; TOB: Tobramicina; SAM: Ampicilina-Sulbactam; COL: Colistina; CCV: Cefazidima-clavulánico; MNO: Minociclina; TGC: Tigeciclina

ANEXO N° 05: DATOS DE LAS CEPAS

CEPA	PROCEDENCIA	EDAD PACIENTE	TIPO DE MUESTRA
Aba-1	UTI	30	Herida Quirurgical
Aba-2	Medicina general	77	Bronquial
Aba-3	Obstetricia	72	Sangre
Aba-4	Medicina general	23	Traqueal
Aba-5	Obstetricia	20	Bronquial
Aba-6	Neumologia	55	orina
Aba-7	UTI	25	Bronquial
Aba-8	Cirugia Toraxica	60	Herida
Aba-9	Obstetricia	75	Bronquial
Aba-10	Neumologia	27	Liquido Pleural
Aba-11	UTI	34	Traqueal
Aba-12	Obstetricia	78	esputo
Aba-13	Cirugia General	71	Bronquial
Aba-14	UTI	66	Bronquial
Aba-15	Cirugia General	25	Punta de cateter central
Aba-16	UTI	22	Liquido ascitico
Aba-17	Obstetricia	24	Bronquial
Aba-18	Cirugia General	76	Bronquial
Aba-19	Medicina general	42	Traqueal
Aba-20	UTI	76	Traqueal
Aba-21	UTI	39	Bronquial
Aba-22	Medicina general	30	Sangre
Aba-23	UTI	38	Bronquial
Aba-24	Neumologia	48	Liquido Pleural
Aba-25	Medicina general	47	secreción
Aba-26	Medicina general	77	Bronquial
Aba-27	UTI	38	Bronquial
Aba-28	Neumologia	48	Liquido Pleural
Aba-29	UTI	65	Traqueal
Aba-30	UTI	60	Punta de cateter central
Aba-31	Medicina general	65	Bronquial
Aba-32	Medicina general	53	Sangre
Aba-33	Cirugia General	48	Bronquial
Aba-34	Obstetricia	60	Bronquial
Aba-35	Obstetricia	76	Bronquial
Aba-36	Cirugia General	53	Bronquial
Aba-37	Pediatrica General	8	Punta de cateter central
Aba-38	UTI	53	Bronquial
Aba-39	Cirugia General	34	liquido cefaloraquidio
Aba-40	Medicina general	34	Bronquial

Aba: Cepa de *Acinetobacter baumannii*

ANEXO N° 06: FENOTIPADO

Cepa	D				B				
	BlueCarba		eCIM	RESULTADO	BlueCarba		eCIM	Sinergismo	RESULTADO
	120 min	150 min			30 min	60 min			
Aba-1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-2	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Aba-3	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Aba-4	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-5	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-6	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-7	1	1	0	1	1	1	1	1	1
Aba-8	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-9	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-10	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-11	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-12	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-13	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-14	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Aba-15	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-16	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-17	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-18	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-19	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-20	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-21	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Aba-22	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-23	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Aba-24	1	1	1	1	0	1	0	0	0
Aba-25	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Aba-26	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-27	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-28	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-29	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-30	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-31	1	1	0	1	1	1	1	1	1
Aba-32	1	1	0	1	0	0	1	1	1
Aba-33	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-34	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-35	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-36	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-37	1	1	1	1	0	1	0	0	0
Aba-38	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Aba-39	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Aba-40	1	1	1	1	0	1	0	0	0

Aba: Cepa de *Acinetobacter baumannii*. D: Oxacilinasas. B: Metalobetalactamasas

ANEXO N° 07: GENOTIPADO

CEPAS	OXA				MTBL		IDENTIFICACIÓN	
	OXA 23	OXA 24	OXA51	OXA 58	IMP	VIM	REC	ITS
Aba-1		1	1				1	1
Aba-2	1		1				1	1
Aba-3		1	1				1	1
Aba-4		1	1				1	1
Aba-5		1	1				1	1
Aba-6		1	1				1	1
Aba-7			1		1		1	1
Aba-8	1		1				1	1
Aba-9		1	1				1	1
Aba-10		1	1				1	1
Aba-11		1	1				1	1
Aba-12		1	1				1	1
Aba-13		1	1				1	1
Aba-14		1	1				1	1
Aba-15	1		1				1	1
Aba-16	1		1				1	1
Aba-17	1	1	1				1	1
Aba-18		1	1				1	1
Aba-19		1	1				1	1
Aba-20	1		1				1	1
Aba-21		1	1				1	1
Aba-22		1	1				1	1
Aba-23		1	1				1	1
Aba-24		1	1				1	1
Aba-25	1		1				1	1
Aba-26	1	1	1				1	1
Aba-27	1		1				1	1
Aba-28		1	1				1	1
Aba-29		1	1				1	1
Aba-30	1		1				1	1
Aba-31	1		1		1		1	1
Aba-32		1	1				1	1
Aba-33		1	1				1	1
Aba-34		1	1				1	1
Aba-35	1	1	1				1	1
Aba-36		1	1				1	1
Aba-37		1	1				1	1
Aba-38	1	1	1				1	1
Aba-39	1		1				1	1
Aba-40		1	1				1	1

Aba: Cepa de *Acinetobacter baumannii*.